

Tesis Doctoral

**METABOLISMO DEL AZUFRE EN LA SIMBIOSIS
GUISANTE - *RHIZOBIUM***

SULPHUR METABOLISM IN THE PEA – *RHIZOBIUM* SYMBIOSIS

Memoria presentada por Olaya Muñoz Azcárate para optar al grado de Doctor con mención
“Doctor Internacional”

Pamplona, Julio 2014

Cesar Arrese-Igor Sánchez, Catedrático de Fisiología Vegetal del Departamento de Ciencias del Medio Natural de la Universidad Pública de Navarra,

INFORMA

Que Dña. Olaya Muñoz Azcárate ha realizado su Tesis Doctoral, *Metabolismo del azufre en la simbiosis guisante-Rhizobium/Sulphur metabolism in the pea-Rhizobium symbiosis*, bajo mi Dirección.

Que durante el desarrollo de la misma ha realizado una estancia de más de seis meses en el prestigioso John Innes Centre, realizando estudios de mutantes en el metabolismo de azufre en *Rhizobium*.

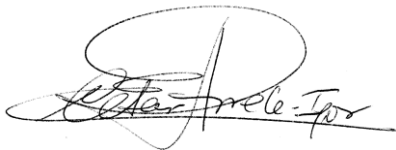
Que los resultados de la Tesis resultan una contribución relevante para el progreso de la Ciencia y que, próximamente, serán publicados en revistas de prestigio.

Que parte de la Tesis está escrita en inglés.

Por todo ello, cumple los requisitos formales y científicos para optar a la “Mención Internacional”, por lo que

INFORMO FAVORABLEMENTE

En Pamplona, a 30 de junio de 2014



Fdo. Cesar Arrese-Igor

Esta tesis ha sido financiada por los proyectos:

AGL2008-00069: “Respuesta de la fijación de nitrógeno en leguminosas a condiciones ambientales adversas: integración de los mecanismos implicados en leguminosas de grano y forrajeras”.

Ministerio de Ciencia e Innovación

AGL2011-30386-C02-01: “Reevaluación de los efectos fuente-sumidero y el transporte a larga distancia en la regulación de la fijación de nitrógeno en leguminosas bajo condiciones adversas”.

Ministerio de Economía y Competitividad

Para la elaboración de esta tesis he disfrutado de una beca predoctoral del programa FPI del Ministerio de Economía y Competitividad

AGRADECIMIENTOS

A veces es necesario subirse a lo más alto para ver las cosas desde arriba, con otra perspectiva. Por eso, la mayor recompensa del montañero es culminar una cumbre y darse cuenta del camino recorrido. Para mí, alcanzar esta cumbre y acabar por fin esta tesis compensa todas las “pájaras” que he tenido a lo largo de estos cinco años. Pero esto no habría sido posible sin el apoyo moral y “logístico” de muchas personas.

En primer lugar, agradecer a mi director, el Dr. Cesar Arrese-Igor, por haberme rescatado para la ciencia, y haberme elegido para realizar la tesis. A pesar de no haber podido dedicarme todo el tiempo que requería (o puede que gracias a ello), su filosofía de “dejarnos pensar” me ha hecho aprender a organizarme, a diseñar experimentos, y a investigar de forma independiente. Gracias por tu guía, tus consejos y tus enseñanzas.

Quisiera agradecer también a los profesores del Área de Fisiología Vegetal, en especial a los Drs. Pedro Aparicio, Mercedes Royuela, Ana Zabalza y Esther González, por prestarme su ayuda y consejos cuando los he necesitado, y por sus ánimos, sobre todo al final.

A Gustavo Garijo, por las determinaciones analíticas y sus didácticas explicaciones sobre los fundamentos de la electroforesis capilar y la integración de picos, y en especial por pelearse con la fuente láser para que pudiera incluir los resultados de tioles en esta tesis.

Al grupo de “fijadores”: Joseba, por enseñarme los entresijos del equipo de fijación, y por preocuparse por “el flujo”; a Cristina, por amenizar esos muestreos interminables cogiendo nódulos y por su gran ayuda en el laboratorio, a Karla por su ayuda, sobre todo para “desnodular”, y a Maribel, por su apoyo en problemas comunes a las dos, y por ayudarme a despejar la mente y desahogarme en esta larga fase final.

Al resto de compañeros del Departamento, con quienes he compartido muy buenos momentos dentro y fuera de la Uni: juevintxos, San Isidro, despedidas, congresos.... A Esti L., por su ayuda con las actividades enzimáticas, incluso a distancia, y por sus consejos. A Oscar y Xabi, por esos interesantes debates. A mis compañeras de despacho, Maria, Amaia Z., Miriam, Erena, y Amaia S., por su ayuda en muestreos y en el labo, sus consejos y ánimos y por crear un buen ambiente de trabajo. A Inma, por haber compartido juntas la agonía y trámites del final de la tesis, y a Irantzu, por resolverme las dudas con el Ministerio. A ellos y al resto de compañeros: Maitane, Bea, Iván, Idoia, Maren, Sergio,...gracias por todo lo que hemos vivido, madurado y aprendido juntos en estos años.

A mis compañeros de despacho en la etapa de escritura, Juan y Maite, por hacerme compañía y romper de vez en cuando el sonido de las teclas del ordenador con su conversación, por sus buenas ideas para la redacción de la tesis y por subirme la moral.

Buena parte de esta tesis se ha realizado gracias a las excelentes colaboraciones con los dos grupos en los que he estado de estancia. I would like to thank Prof. Philip Poole, for accepting me in his group at the Molecular Microbiology Department of the John Innes Centre, and allow me to work in a high-level scientific environment during almost 9 months. Thanks for being always available to answer my questions about molecular biology, and for your enthusiastic view of science. Special thanks to KK, for his help and patience teaching me all the molecular biology and microbiology techniques; to Guojun, who finished the work within the project when I left Norwich; also to Alison and Graham, for their help in the mutant construction; Andrzej, for the “tea-times”, and Ely and Rob, for their cheerfulness in the lab and the good moments shared. I am also grateful to Prof. Stanislav Kopriva, for his collaboration in this project, and his corrections. A Lorena, por nuestros “Spanish breaks” y por su alegría contagiosa. A la comunidad española de

Norwich: Maite, Esther, Paula, Azahara, Antonio,...por los buenos ratos en el JIC y fuera de él, en especial compartiendo la emoción de la Eurocopa 2012 en los pubs ingleses.

Gracias a los Drs. Luis C. Romero y Cecilia Gotor por haberme aceptado en el Grupo de Metabolismo de Cisteína y Señalización del IBVF de Sevilla, para una estancia corta pero intensa (y calurosa). A Cecilia, por tener siempre su puerta abierta para resolver mis dudas, por estar pendiente de los resultados y dar soluciones incluso después de la estancia, y por sus ánimos. A Luis, gracias por preocuparse por mis resultados y problemas en el laboratorio, y por implicarse en el proyecto a pesar de sus obligaciones administrativas. A Inma por esas manos de oro, por enseñarme y ayudarme con la actividad y los western con su especial desparpajo, por su cercanía y su forma de ver siempre el lado bueno y por hacer todo el trabajo que quedó pendiente. A Ana e Irene, gracias por vuestra alegría sureña, por soportar la “peste” a sulfuro en el labo y por las cervecitas de los viernes.

Quisiera recordar también a los amigos y compañeros con los que compartí mi “primer intento de tesis” en Murcia: en especial a Bea, Mari Jose, Ana y Vicente, por las risas, aventuras y viajes del “equipo C”, a Elenilla por ser ella misma y hacerme reír cuando más lo necesitaba y a César, por nuestra “terapia de grupo” ante las adversidades. Gracias por mantener el contacto a pesar de la distancia. A Pepe Hernández, Nieves, Merch y M. Ángeles Pedreño, y a los becarios del CEBAS-CSIC, gracias por haberme animado a seguir mi carrera investigadora y por convencerme de lo que valía a pesar de los obstáculos.

Durante la carrera no había planeado dedicarme a la investigación, pero la beca Leonardo en Rothamsted Research (Reino Unido) me hizo cambiar de idea. I am especially grateful to Prof. Malcolm Hawkesford for giving me the opportunity to work in his group, for all I learnt with him, and for encourage me to find a PhD and work in research. It will be a pleasure for me having you in my thesis tribunal. Thanks also to Dr. Jonathan Howarth, for teaching me in the lab, always with a smile. A la Spanish Community de Rothamsted, porque gracias a todos los planes juntos mi estancia allí fue como un Erasmus.

A mi “hermanita cántabra” Loida, porque las dos llevamos tiempo cogiendo pipetas en mil sitios como nómadas científicas, y me entiende y anima como nadie. Gracias por todos estos años de amistad, locuras y fatigas, viéndonos cada vez en una ciudad distinta.

A mis padres, porque saben que para hacer cima hay que hacer un monte dos veces, y por estar ahí y quererme aunque a veces no nos entendamos. A mi madre por preocuparse por mí en la distancia y a mi padre porque siempre presume de hija, y ahora que es doctora, aún más. Por cargarme de sidra, asturianía y cariño cada vez que volvía. Para que entendáis que mi tiempo nunca es perdido, que la profesionalidad y los logros no sirven de nada si no se crece como persona y que mi mayor fracaso sería dejar de aprender y no ser feliz, aunque fuera la mejor en ciencia; y para que confiéis más en mí. A mi hermana “noruega” Kitu, para que seamos cómplices de verdad más pronto que tarde, aunque nos veamos poco, y y a mi tía Ana, que me quiere mucho aunque casi no la llame.

No encuentro palabras para agradecer todo el apoyo y el cariño que me ha brindado Pablo durante estos años en Pamplona, sobre todo en este último año. Gracias por afrontar juntos las hostilidades, por enseñarme a ser mejor persona, por creer en mí más que yo misma, y por hacer de psicólogo ayudándome a superar mis miedos. Tu entusiasmo y tu espíritu emprendedor han sido la mejor energía e inspiración para esta tesis. Gracias por estar a mi lado en nuestra simbiosis particular, y por hacer que salga el sol entre los dos a pesar de las tormentas de cada uno.

Citar las fuentes forma parte del rigor científico, así que he de agradecer también a Pablo su original idea para el diseño de la portada.

A mis padres, por el puerto de abrigo

*A Pablo, por la brújula que señala el sur
para que encuentre mi camino*

“El que no inventa, no vive”

(The one who does not invent, does not live)

Ana María Matute, escritora (1925 – 2014)

*“El verdadero signo de inteligencia no es el conocimiento,
sino la imaginación”*

(The true sign of intelligence is not knowledge, but imagination)

Albert Einstein, físico (1879 – 1955)

PUBLICACIONES

Los resultados de este estudio se recogen en las siguientes publicaciones científicas:

Muñoz-Azcárate O, Aldasoro J, Arrese-Igor C (2010)

Growth, nitrogen fixation and nodule functioning of pea (*Pisum sativum* L.) plants as affected by sulphur deficiency. En: Aspectos fisiológicos, agronómicos y ambientales en la nutrición mineral de las plantas. Ed. J.M. Estavillo. ISBN: 978-84-614-3065-9.

Muñoz-Azcárate O, Aldasoro J, Arrese-Igor C (2011)

Physiological and metabolic changes in nodulated pea plants induced by sulphur deficiency. En: Libro de resúmenes de la XIX Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal. Ed. Universitat Jaume I, Castellón de la Plana. ISBN: 978-84-8021-805-4.

Munoz-Azcarate O, Arrese-Igor C

Responses of nodulated pea plants (*Pisum sativum* L.) to sulphur deficiency depend on nodule developmental stage: physiological and metabolic implications (manuscrito en preparación).

Munoz-Azcarate O, Karunakaran R, Cheng G, Kopriva S, Arrese-Igor C, Poole PS

A *cysH* mutant strain of *Rhizobium leguminosarum* RL3841 defective in sulphate assimilation: analysis of auxotrophy for sulphur compounds in free-living and symbiotic conditions. (manuscrito en preparación).

Munoz-Azcarate O, Moreno I, Arrese-Igor C, Romero LC, Gotor C

The role of nodules in cysteine biosynthesis in pea (*Pisum sativum* L): regulation of O-acetylserine(thiol)lyase under sulphur-limited and drought stress conditions. (manuscrito en preparación).

ABREVIATURAS/ABBREVIATIONS

2OG	2-oxoglutarato
AAT	Aspartato aminotransferasa/aspartate aminotransferase
ABA	Ácido abscísico
ABC	ATP-binding cassette
AMA/S	Acid minimal salts agar growth medium (agar/liquid)
ANA	Actividad aparente de la nitrogenasa/apparent nitrogenase activity
ARA	Actividad reductora de acetileno/acetylene reductive activity
APK	Adenosín fosfosulfato quinasa
APR	Adenosín fosfosulfato reductasa/adenosine phosphosulphate reductase
APS	Adenosín 5'-fosfosulfato/adenosine phosphosulphate
AS	Asparagina sintetasa/asparagine synthase
ATPS	ATP-sulphurilasa
DMS	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EC	Enzyme comission
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FBN/BNF	Fijación biológica de nitrógeno/biological nitrogen fixation
GABA	Ácido gamma-amino butírico/gamma-aminobutyric acid
GOGAT	Glutamato sintasa/glutamate synthase
GS	Glutamina sintetasa/glutamine synthase
GSH	Glutación reducido/reduced glutathione
GSSG	Glutación oxidado/oxidised glutathione
hGSH	Homoglutación reducido/reduced homoglutathione
hGSSG	Homoglutación oxidado/oxidised homoglutathione
HPCE	Electroforesis capilar de alta resolución
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IA/AI	Invertasa alcalina/alkaline invertase
ICDH	Isocitrato deshidrogenasa/isocitrate dehydrogenase
ICP	Induced-coupled plasma spectroscopy
IRLC	Inverted repeat-lacking clade
Lb	Leghemoglobina/leghaemoglobin
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MDH	Malato deshidrogenasa/malate dehydrogenase
MGT	Tiempo medio de generación/mean generation time
MOPS	Ácido γ -morfolinopropanosulfónico
MPB/PBM	Membrana peribacteroidea/peribacteroid membrane
NAD	β -nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	β -nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
NADP	β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)
NCR	Nodule cysteine rich peptides
OAA	Oxalacetato
OAS	O-acetilserina

OASTL	O-acetilserín(tiol)liasa/O-acetylserine(thiol)lyase
OD/DO	Optical density/densidad óptica
PAPS	Fosfoadenosín 5'-fosfosulfato/phosphoadenosine 5'-posphosulphate
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa/phosphoenolpyruvate carboxylase
PF/DW	Peso seco/dry weight
PF/FW	Peso fresco/fresh weight
PGPR	Plant growth-promoting rhizobacteria
PHB	Polihidroxibutirato
PK	Fosfoquinasa
PLP	Piridoxal 5'-fosfato
PP _i	Pirofosfato
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAM	S-adenosil metionina
SAT	Serin acetil-transferasa/serine acetyltransferase
SE	Standard error
SiR	Sulfito reductasa/sulphite reductase
SS/SuSy	Sacarosa sintasa/sucrose synthase
SULTR	Transportador de sulfato
TCA	Ciclo de los ácidos tricarboxílicos /tricarboxylic acid cycle
TY	Medio de cultivo con triptona de levadura (tryptone yeast)
UDP	Uridín difosfato
UDPG	Uridín difosfoglucosa
UDPGPP	Uridín difosfoglucosa pirofosforilasa
v/v	Volúmen por volumen
YEM	Medio de crecimiento con extracto de levadura y manitol
YEMA	medio de crecimiento con extracto de levadura, manitol y agar
γ-EC	γ-glutamilcisteína/γ-glutamylcysteine

RESUMEN

Las leguminosas representan un cultivo de gran valor para la agricultura sostenible, debido a su importancia en la alimentación humana y animal, y también por su efecto mejorador del suelo. Este efecto se debe en gran parte al proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN) que tiene lugar en órganos especializados llamados nódulos, en asociación con bacterias del suelo. El mayor problema de la FBN en sistemas agrícolas es su sensibilidad a estreses abióticos, entre ellos la deficiencia de azufre (S). Debido a los pocos estudios existentes acerca de los efectos de este déficit en la FBN, en el primer capítulo se planteó determinar los efectos fisiológicos de la deficiencia de S en plantas de guisante (*Pisum sativum* L.) inoculadas con la bacteria *Rhizobium leguminosarum* cuando ésta deficiencia se da en dos etapas diferentes del desarrollo del nódulo, así como las respuestas metabólicas de la planta asociadas a dicho déficit. La deficiencia de azufre produjo una disminución en la biomasa nodular, la tasa de fijación y la fotosíntesis. Además, la limitación de azufre durante 28 días produjo variaciones en el contenido nodular de varias familias de aminoácidos, así como un descenso en el contenido de tioles en parte aérea, raíz y nódulos, sugiriendo un desequilibrio entre los metabolismos del N y del S, a nivel de planta entera. La concentración nodular de sacarosa y glucosa también disminuyó, si bien el malato y citrato se acumularon en nódulos después de 28 días de limitación de azufre. Los enzimas sacarosa sintasa y fosfoenolpiruvato carboxilasa, claves para la provisión de energía al bacteroide, disminuyeron con la deficiencia de azufre. Estos resultados indican que la inhibición de la fijación en condiciones limitantes de azufre puede estar causada por una pérdida de funcionalidad del bacteroide, y, en plantas con limitación de azufre durante 28 días, también por un desarrollo deficiente de los nódulos.

En el segundo capítulo se planteó poner a punto el ensayo de actividad O-acetil-L-serin(tiol)liasa (OASTL) en nódulos y estudiar su regulación en plantas sometidas a deficiencia de azufre (con los mismos tratamientos que en el capítulo 1) y en plantas sometidas a estrés hídrico, debido a la ausencia de evidencias bibliográficas sobre la regulación de este enzima en nódulos. Se observó mayor actividad específica OASTL en nódulos que en raíces y en hojas, en todos los tratamientos. Por otro lado, en plantas deficientes en S, la actividad OASTL aumenta respecto al control, en hojas y raíces,

mientras que disminuye en nódulos, lo cual se correlaciona con un aumento en la abundancia de la isoforma citosólica OASA en hojas y un descenso en nódulos tras 28 días de limitación de S, si bien la expresión del gen *OASA* en nódulos no pareció ser afectada. Esto sugiere una regulación diferente del enzima en nódulos, ya que la falta de azufre provoca, en general, un incremento de la actividad. En plantas sometidas a sequía, sin embargo, se observó en general una inhibición de la actividad, si bien tanto los niveles de proteína como la expresión génica de *OASA* sólo se vieron afectados por el déficit hídrico en nódulos. Los altos niveles de actividad y expresión génica de *OASTL* detectados en nódulos ponen de manifiesto la importancia de éstos en la asimilación del azufre en plantas fijadoras, y sugiere nuevos mecanismos de regulación de este enzima y de la ruta en general.

El objetivo del tercer capítulo fue profundizar en los mecanismos de asimilación de azufre en *R. leguminosarum*, vida libre y en simbiosis con plantas de guisante, así como las fuentes de azufre utilizadas por la bacteria. Para ello se construyó una cepa mutante de *R. leguminosarum* defectiva en APS reductasa, enzima clave en dicha ruta, y se estudió su crecimiento en diversas fuentes de azufre. La cepa mutante *aapbra* es defectiva en dos transportadores de tipo ABC, Aap y Bra, con amplia especificidad para el transporte de aminoácidos a través de la membrana bacteroidal. Se incluyó en este estudio con el fin de conocer su papel en el transporte de aminoácidos azufrados y sulfato. *cysH* no fue capaz de crecer en sulfato, pero sí de utilizar cisteína y glutatión como fuentes de azufre, si bien su crecimiento en metionina y sulfonatos se vio muy limitado, en comparación con el de 3841. El crecimiento de *aap/bra* en estos compuestos es similar al observado para la cepa parental, lo cual indica que Aap y Bra no son los principales transportadores para los aminoácidos azufrados, y sugiere la existencia de sistemas de transporte específicos para estos aminoácidos. Por otra parte, el mutante *cysH* fue capaz de inducir la formación de nódulos funcionales en guisantes, y su capacidad para fijar nitrógeno fue similar a la de plantas inoculadas con la cepa parental, sugiriendo que el sulfato no es la fuente principal de azufre para los bacteroides. Sin embargo, su capacidad para nodular en competición con la cepa parental se vio drásticamente reducida, lo cual puede deberse a que el crecimiento del mutante en la rizosfera se ve afectado por su incapacidad para asimilar sulfato.

ABSTRACT

Leguminous plants are crops with a high value in sustainable agriculture, due to their importance for both human food and animal feed, and also because of their effect in soil amelioration. This effect is mainly due to the biological nitrogen fixation process, which takes place in specialized organs called nodules, in association with soil bacteria. The main problem of BNF in agriculture is its sensitivity to abiotic stresses, amongst them sulphur deficiency (S). Giving the scarce information about the effects of this limitation in BNF, the aim of the first chapter was to determine the physiological effects of S deficiency in pea plants (*Pisum sativum* L.) inoculated with soil bacteria *Rhizobium leguminosarum*, when this deficiency takes place in two different stages of nodule development, and also the plant metabolic responses associated to this limitation. S deficiency provoked a decline in nodule biomass, photosynthesis and nitrogen fixation. Also, a long-term S deficiency (28 days) led to variations in nodule content of several families of amino acids, as well as to a drastic decline in thiol content in shoots, roots and nodules, suggesting an imbalance between N and S metabolism at the whole plant level. Sucrose and glucose also diminished under S deficiency, although malate and citrate were found to accumulate in nodules after 28 days of S limitation. Nodule enzymes sucrose synthase and phosphoenolpyruvate carboxylase, key in the energy provision to bacteroid, were inhibited by S deficiency. Altogether, these results indicate that BNF inhibition by S limitation might be caused by a loss of functionality in bacteroids, and, in plants subjected to S limitation during 28 days, also as a result of an impaired nodule development.

In the second chapter, O-acetyl-L-serine(thiol)lyase (OASTL) activity was adapted and assayed in nodules, and the regulation of this enzyme in plants subjected to sulphur deficiency or drought stress was studied, giving the lack of bibliographic information about the regulation of this enzyme in nodules. The highest specific activity and the highest gene expression levels were observed for nodules, in all treatments. Moreover, in S-limited plants, OASTL activity increased in shoots and root, while a down-regulation was observed for nodules, which was correlated with an increase in the cytosolic isoform (OASA) protein levels in shoots and a decrease in

nodules in plants subjected to S deficiency during 28 days, although gene expression of *OASA* seemed not to be affected by S limitation. These results open up the possibility of different regulatory mechanisms existing in pea nodules for OASTL, as a response to S limitation, giving that S deficiency provokes, in general, an up-regulation in this enzyme. In drought-stressed plants, an inhibition in the activity was observed in shoot, root and nodules; however, *OASA* protein abundance and gene expression levels were affected by drought stress only in nodules. The high levels of activity and gene expression found in nodules highlight the importance of these in the S assimilation pathway in N fixing plants, and suggest novel regulatory mechanisms for this enzyme and for the whole pathway in general.

The general purpose of the third chapter was to deep into the mechanisms of sulphur acquisition and sulphur sources used by *Rhizobium leguminosarum* in legume nodules and in free-living conditions. The *cysH* mutant strain was obtained, defective in *cysH* gene, encoding for APS reductase, a key enzyme in sulphur assimilation in bacteria, and its growth in several sulphur sources was tested. *aap/bra* double mutant strain is defective in two ABC transporters, Aap and Bra, with a broad specificity for the transport of amino acids across the peribacteroid membrane. It was included in the present study in order to know its role in the transport of sulphur amino acids and sulphate in *R. leguminosarum*. *cysH* was not able to grow with sulphate as the sole sulphur source, but it could utilize cysteine and glutathione, although its growth with methionine and sulphonates was severely impaired, compared with that of the parent strain. Growth curves of *aap/bra* in these compounds were indistinguishable from those of parent strain, suggesting that neither Aap nor Bra are the main transporters for sulphur aminoacids, and opens up the possibility of unknown specific transport systems for these amino acids. Also, *cysH* mutant was able to induce the formation of functional nodules in pea, since its ability to fix nitrogen was similar to that of plants inoculated with the parent strain, suggesting that sulphate is not the main sulphur source for bacteroids. Nevertheless, it was severely impaired in its nodule occupancy ability, in competition with 3841 parent strain, suggesting that the inability of the mutant strain to assimilate sulphate affects its ability to grow in the rhizosphere.

INDICE GENERAL/INDEX

INTRODUCCIÓN

A. EL NITRÓGENO	3
A.1. El ciclo biogeoquímico del nitrógeno	3
A.1.1. Procesos biológicos en el ciclo del nitrógeno	5
A.1.2. El N en las plantas	5
B. FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO	6
B.1. Organismos fijadores de vida libre	6
B.2. Simbiosis fijadoras con no leguminosas	9
B.3. Simbiosis <i>Rhizobium</i>-leguminosa	11
B.3.1. Clasificación taxonómica de los rizobios	13
B.3.2. El género <i>Rhizobium</i>	15
B.3.3. Establecimiento de la simbiosis: formación del nódulo	16
B.3.3.1. Reconocimiento entre los simbiontes: flavonoides y factores Nod	16
B.3.3.2. Adhesión a las raíces y transducción de señales	17
B.3.3.3. Infección de la raíz y formación del primordio de nódulo	19
B.3.3.4. Organogénesis y maduración del nódulo. Tipos de nódulos	20
B.3.3.5. Diferenciación de los rizobios a bacteroides	22
B.3.3.6. Activación de la fijación de nitrógeno	24
C. METABOLISMO NODULAR	25
C.1. Nitrogenasa	25
C.2. Mecanismos de control del flujo de oxígeno	27
C.2.1. Barrera a la difusión de oxígeno	28
C.2.2. Leghemoglobina	28
C.2.3. Oxidasas terminales	29
C.3. Metabolismo del carbono	30
C.3.1. Catabolismo de sacarosa y producción de malato	30
C.3.2. Metabolismo de carbono en el bacteroide: sistema Dct y ciclo TCA	32
C.4. Metabolismo del nitrógeno	35
C.4.1. Suministro de nitrógeno a la fracción vegetal	35
C.4.2. Asimilación del amonio	37
C.4.3. Exportación del nitrógeno fijado a la planta	37
C.4.4. Reciclado de aminoácidos: sistema Aap/Bra	40

D. IMPORTANCIA AGRÍCOLA Y AMBIENTAL DE LAS LEGUMINOSAS Y LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO	42
D.1. Las leguminosas	42
D.2. Valor ecológico y agronómico de la FBN	44
D.3. Fijación biológica de nitrógeno vs fertilización nitrogenada	44
D.4. Fijación de nitrógeno y agricultura sostenible	47
D.5. Factores que limitan el uso de la fijación de nitrógeno en agricultura	48
D.6. Estrategias para mejorar la fijación de nitrógeno	51
D.6.1. Optimización de las simbiosis rizobio-leguminosa	52
D.6.2. Desarrollo de simbiosis fijadoras en cereales	53
D.6.3. Transformación genética de cereales con genes <i>nif</i>	54
E. EL AZUFRE	55
E.1. Ciclo biogeoquímico del azufre	55
E.2. Metabolismo del azufre en plantas	55
E.2.1. Compuestos azufrados en plantas	57
E.2.1.1. Cisteína	57
E.2.1.2. Metionina	58
E.2.1.3. Grupos tiol	58
E.2.1.4. Glutatión	58
E.2.1.5. Metabolitos secundarios azufrados	60
E.2.2. Fases de la asimilación de sulfato y biosíntesis de cisteína	62
E.2.2.1. Transporte de sulfato	62
E.2.2.2. Activación de sulfato	64
E.2.2.3. Reducción del sulfato activado a sulfuro	65
E.2.2.4. Incorporación del azufre a esqueletos carbonados: enzima OASTL	66
E.2.3. Regulación de la biosíntesis de cisteína	67
E.2.3.1. Factores ambientales y modulación de señales internas	67
E.2.3.2. Regulación del complejo cisteína sintasa	71
E.3. Metabolismo del azufre en bacterias	72
E.3.1. Asimilación de sulfato. APS reductasa	73
E.4. Deficiencia de azufre	74
E.4.1. Causas de la deficiencia de azufre en agricultura	74
E.4.2. Consecuencias de la deficiencia de azufre	76

<u>OBJETIVOS</u>	79
<u>RESEARCH OBJECTIVES</u>	83
<u>I. MATERIAL Y MÉTODOS</u>	87
I.1. EL MACROSIMBIONTE: <i>PISUM SATIVUM</i> L.	89
I.1.1. Variedad Sugar boys (<i>Pisum sativum</i> L cv Sugar snap)	90
I.1.2. Variedad Avola	91
I.2. EL MICROSIMBIONTE: <i>RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM</i> BIOVAR <i>VICIAE</i>	91
I.2.1. Cepa NLV8	92
I.2.2. Cepa 3841	92
I.2.3. Cepa RU1722 (doble mutante <i>aap/bra</i>)	92
I.3. MANTENIMIENTO Y CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS BACTERIANOS	93
I.3.1. Medios de cultivo para la cepa NLV8	93
I.3.2. Medios de cultivo y antibióticos para cepa 3841 y derivadas	94
I.4. CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS	96
I.4.1. Germinación	96
I.4.2. Imposición de la deficiencia de azufre	97
I.4.1.1. Hidropónico puro	97
I.4.1.2. Hidropónico con sustrato	99
I.4.2. Imposición de los tratamientos de sequía	99
I.5. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS	100
I.5.1. Potencial hídrico	100
I.5.2. Fotosíntesis	101
I.5.3. Contenido total de clorofila: SPAD	101
I.5.4. Fijación de nitrógeno (Actividad Aparente de la Nitrogenasa)	102
I.5.5. Parámetros de crecimiento y contenido hídrico	104
I.5.6. Análisis de elementos minerales	104

I.6. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS	104
I.6.1. Extracción y determinación de carbohidratos	104
I.6.2. Extracción y determinación de ácidos orgánicos y sulfato	106
I.6.3. Extracción y determinación de aminoácidos y aminotioles	106
I.7. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS NÓDULARES	108
I.7.1. Extracción y determinación de proteína soluble	108
I.7.2. Ensayo de actividades: óxido-reducción de NAD(P)H	109
I.8. ACTIVIDAD O-ACETILSERIN(TIOL)LIASA	112
I.9. INMUNODETECCIÓN DE OASA	114
I.9.1. Electroforesis y western-Blot	114
I.9.2. Detección de OASA por quimioluminiscencia	116
I.10. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE OASA	116
I.10.1. Extracción de RNA	116
I.10.2. Síntesis de cDNA (transcripción inversa o RT)	117
I.10.3. Diseño de cebadores para qPCR	117
I.10.4. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	118
I.11. DETERMINACIÓN DE TIOLES POR HPLC	119
I.12. TÉCNICAS DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR	120
I.12.1. Construcción del mutante <i>cysH</i> de <i>R. leguminosarum</i>	120
I.12.1.1. Amplificación de un fragmento del gen <i>cysH</i>	120
I.12.1.2. Ligación entre el plásmido y el fragmento	123
I.12.1.3. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	124
I.12.1.4. Conjugación de <i>R. leguminosarum</i>	126
I.12.1.5. Mutagénesis de Rlv3841 por inserción del plásmido pLMB630	128
I.12.2. Crecimiento de las bacterias en compuestos azufrados	129
I.12.2.1. Determinación de las concentraciones de estudio	130
I.12.2.2. Inducción del ayuno de azufre	131
I.12.2.3. Crecimiento en sulfato, aminoácidos azufrados y glutatión	131
I.12.2.4. Utilización de sulfonatos	131
I.12.3. Cálculo del tiempo medio de generación	132
I.12.4. Complementación del mutante <i>cysH</i>	132

I.12.4.1. Amplificación del fragmento <i>cysHDN</i>	132
I.12.4.2. Clonación en plásmido y transformación de células competentes	133
I.12.4.3. Conjugación y selección de conjugantes	134
I.12.4.4. Ensayo de complementación	135
I.13. ESTUDIO DEL FENOTIPO SIMBIÓTICO DE <i>CYSH</i>	136
I.13.1. Nodulación y fijación de nitrógeno	136
I.13.1.1. Inoculación y cultivo de las plantas	136
I.13.1.2. Fijación de nitrógeno (Actividad Reductora de Acetileno)	137
I.13.1.3. Comprobación del fenotipo en bacterias aisladas de plantas	138
I.13.2. Ensayo de competitividad por nodulación del mutante <i>cysH</i>	138
1. <u>CHAPTER 1</u>	141
1.1. INTRODUCTION	143
1.2. OBJECTIVES	145
1.3. EXPERIMENTAL PROCEDURES	146
1.4. RESULTS	147
1.4.1. Growth and physiological parameters	147
1.4.2. Mineral elements and sulphate content	148
1.4.3. Amino acids	151
1.4.3.1. S-containing amino-acids and amino thiols	151
1.4.3.2. Amino acids involved in nitrogen assimilation	153
1.4.3.3. Branched-chain amino acids	154
1.4.3.4. Aromatic amino acids	155
1.4.3.5. Other amino acids	155
1.4.4. Aminothiols	157
1.4.5. Organic acids	161
1.4.6. Carbohydrates	162
1.4.7. Nodule enzymatic activities	163
1.5. DISCUSSION	164
1.6. CONCLUSIONS OF CHAPTER 1	171
2. <u>CHAPTER 2</u>	173
2.1 INTRODUCTION	175

2.2. OBJECTIVES	177
2.3. EXPERIMENTAL PROCEDURES	178
2.4. RESULTS	179
2.4.1. Growth and physiological parameters	179
2.4.2. OASTL activity	181
2.4.3. Immunodetection of OASA (Western-Blot analysis)	184
2.4.4. Expression of <i>OASA1</i> gene	186
2.4.5. Thiol content	187
2.5. DISCUSSION	189
2.6. CONCLUSIONS OF CHAPTER 2	199
<u>3. CHAPTER 3</u>	201
3.1. INTRODUCTION	203
3.2. OBJECTIVES	205
3.2. EXPERIMENTAL PROCEDURES	206
3.3 RESULTS	207
3.3.1. Mutagenesis of <i>cysH</i> gene	207
3.3.1. Growth in sulphur compounds	207
3.3.1.1. Sulphonates	211
3.3.2. Complementation	212
3.3.3. Symbiotic phenotype	213
3.3.4. Rhizosphere competitiveness of <i>cysH</i>	214
3.4. DISCUSSION	215
3.5. CONCLUSIONS OF CHAPTER 3	219
<u>GENERAL CONCLUSSIONS</u>	221
<u>CONCLUSIONES GENERALES</u>	225
<u>BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY</u>	229

INTRODUCCIÓN GENERAL

ser asimilado por las plantas, necesariamente debe ser fijado mediante distintos procesos naturales, gracias a los cuales se fijan aproximadamente 190 millones de T de N al año (Schlesinger, 1997):

- La luz es responsable de cerca del 8% de la fijación de nitrógeno natural (10 mill T de N al año) (Taiz and Zeiger, 2002). Por medio de la luz del sol el vapor de agua y el oxígeno presentes en la atmósfera se convierten en radicales libres hidroxilo altamente reactivos y átomos de hidrógeno y oxígeno libres que atacan las moléculas de dinitrógeno gaseoso (N_2), para formar ácido nítrico (HNO_3)
- Reacciones fotoquímicas: el óxido nítrico (NO) y el ozono (O_3) presentes en la atmósfera reaccionan entre ellos activados por las descargas eléctricas producidas por tormentas, y dan lugar a ácido nítrico (HNO_3), el cual es arrastrado al suelo por la lluvia. Sin embargo, el nitrógeno fijado mediante estas reacciones sólo constituyen un 2% (Galloway et al., 1995)
- Por medio de algunos organismos procariotas, llamados diazotrofos o fijadores de nitrógeno, los cuales reducen el N_2 a NH_4^+ , forma bajo la cual puede ser asimilado. Este proceso se conoce como fijación biológica de nitrógeno (FBN), y constituye la mayor fuente de nitrógeno disponible para los seres vivos, ya que es responsable del 90% del N fijado aportado a la Tierra (Newton, 2000; Smith and Smith, 2001).

Además de estos procesos naturales, también existe la fijación de nitrógeno industrial, basada en el proceso Haber-Bosch, en el cual el N_2 gaseoso procedente de la atmósfera es reducido a NH_4 en presencia de H_2 mediante la aplicación de condiciones de presión y temperatura extremadamente altas ($500^\circ C$ y 300 atm). Este proceso se utiliza para la producción de fertilizantes nitrogenados, y otros productos agrícolas e industriales, y se estima que gracias a él se fijan aproximadamente 80 millones de T de N al año (Vitousek et al., 1997). Este proceso industrial requiere una gran cantidad de energía para alcanzar las condiciones extremas de temperatura y presión requeridas, contribuyendo en gran medida a las emisiones de CO_2 antropogénicas causantes del cambio climático. Además, en el último siglo, la aplicación intensiva de fertilizantes nitrogenados en agricultura ha llevado a importantes perturbaciones en el equilibrio del ciclo del nitrógeno, debidas a la acumulación de nitratos en suelos y aguas y al

aumento de las concentraciones de óxidos nitrosos en la atmósfera (Olivares et al., 2013).

A.1.1. Procesos biológicos en el ciclo del nitrógeno

El NH_4^+ puede ser absorbido y asimilado por las plantas y bacterias en compuestos orgánicos y circular a lo largo de las cadenas alimenticias (asimilación del nitrógeno). Mediante la nitrificación, es oxidado a nitrito (NO_2) y éste a nitrato (NO_3) por diferentes microorganismos del suelo y acuáticos, sobre todo bacterias nitrificantes de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*.

En condiciones de baja concentración de O_2 el NO_3^- puede ser empleado como aceptor de electrones por diferentes microorganismos para obtener ATP. Este proceso, conocido como desnitrificación, es responsable de la salida de N de los ecosistemas como N_2 , u otras formas gaseosas como el óxido nítrico o el óxido nitroso.

La conversión del N orgánico en NH_4 , o amonificación, es debida a la actividad de bacterias y hongos del suelo, y en cierto modo forma parte de la mineralización, que corresponde a la conversión de diferentes formas orgánicas de nitrógeno a formas inorgánicas.

Por último, como ya se ha explicado, el N_2 atmosférico puede ser reducido a NH_4 por procariotas mediante la fijación biológica del nitrógeno, que representa la mayor entrada de nitrógeno molecular al ciclo del nitrógeno.

A.2. El N en las plantas

El N es el elemento mineral que las plantas requieren en mayores cantidades. Constituye entre un 1.5 y un 5% del total del peso seco de la planta, y dada su presencia en las principales biomoléculas, es el cuarto elemento más importante para el desarrollo de las plantas, después del C, H y O. Las formas iónicas preferentes de absorción del N por la raíz son el nitrato (NO_3^-) y el amonio (NH_4^+). Las leguminosas y otras familias de plantas también pueden obtener amonio a partir del N_2 atmosférico gracias a la asociación simbiótica con bacterias del suelo (Bonilla, 2003). En la planta, la mayor parte del N (más del 50%) se encuentra formando parte sobre todo de compuestos de alto peso molecular (proteínas y ácidos nucleicos). Un pequeño

porcentaje está en forma de N orgánico soluble, como constituyente de compuestos nitrogenados de bajo peso molecular (aminoácidos, amidas, aminas, tioles,...), y finalmente, en mucha menos medida, como N inorgánico (iones nitrato y amonio).

Después del agua y del carbono, el N es el nutriente que limita en mayor medida el crecimiento vegetal (Taiz and Zeiger, 2002) y la productividad agrícola, y su deficiencia inhibe rápidamente el crecimiento de la planta. Los suelos agrícolas son frecuentemente deficientes en N, por lo que constituye, junto con el fósforo (P) y el potasio (K), un elemento clave en la nutrición mineral (Graham and Vance, 2000). De hecho, la mayoría de fertilizantes comerciales se componen de una mezcla de sales de N (en forma amoniacal y/o nítrica), P y K, con diferente proporción de cada elemento (complejo NPK).

B. FIJACIÓN BIOLÓGICA DEL NITRÓGENO

El proceso de fijación biológica de nitrógeno se da únicamente en algunos organismos procariotas presentes en el suelo conocidos como diazotrofos o fijadores de nitrógeno, ya que poseen el complejo enzimático nitrogenasa, el cual cataliza la reducción de N atmosférico a amonio. La capacidad para fijar nitrógeno puede determinarse experimentalmente en un organismo por la incorporación de $^{15}\text{N}_2$, o bien por la presencia de los genes *nif*, que codifican para la nitrogenasa. El espectro de organismos diazotrofos es muy amplio, pudiéndose encontrar en casi cualquier hábitat, e incluyen tanto bacterias de vida libre como organismos que forman asociaciones simbióticas con plantas, generalmente leguminosas. En la tabla se resumen los grupos de diazotrofos más representativos. La actividad de la nitrogenasa se inhibe rápidamente en presencia de oxígeno, y por tanto, los organismos diazotrofos son, generalmente, anaerobios estrictos o facultativos, o bien son capaces de crear ambientes microaeróbicos internos para proteger a la nitrogenasa.

B.1 Organismos fijadores de vida libre

Debido a la gran cantidad de energía que se necesita para romper el triple enlace covalente de la molécula de dinitrógeno gaseoso y reducirlo a amonio, la mayoría de bacterias diazotróficas han desarrollado asociaciones simbióticas con plantas, de las

que obtienen la energía necesaria para llevar a cabo el proceso (Lum and Hirsh, 2003). No obstante, hay un amplio rango de procariotas fijadores de nitrógeno de vida libre en el suelo, con representantes en los dominios filogenéticos *Archaea* (arqueobacterias) y *Eubacteria* (bacterias). Dentro de estos últimos hay una amplia diversidad metabólica entre los diazotrofos, existiendo bacterias anaerobias, anaerobias facultativas, microaeróbicas, aerobias estrictas, fotosintéticas, quimorganótrofas, cianobacterias y arqueobacterias metanogénicas, entre otros. En la tabla 1 se esquematizan los diazotrofos de vida libre más representativos. Entre los anaerobios estrictos, hay bacterias no fotosintéticas del género *Clostridium*, así como bacterias reductoras del azufre como *Desulfovibrio* y *Desulfomaculum*, que intervienen en el ciclo biogeoquímico del azufre, y están presentes en suelos contaminados. Las bacterias anaerobias fotosintéticas incluyen los géneros *Allochromatium*, *Thiopedia* y *Ectothiorhodospira*, también importantes para el ciclo del azufre, ya que emplean sulfuro como donador de electrones y son capaces de acumular azufre en el interior de la célula (Friedrich, 1998).

Los anaerobios facultativos carecen de sistemas para proteger la nitrogenasa frente al O₂, y normalmente sólo fijan N₂ en ausencia, o casi ausencia de O₂, es decir, cuando están en anaerobiosis. En este grupo se incluyen bacterias no fotosintéticas de los géneros *Bacillus* y *Erwinia* y así como especies de las bacterias coliformes *Erwinia*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. Además, entre los organismos fotosintéticos de este grupo se encuentran bacterias tolerantes a metales pesados como *Rhodospirillum* y *Rhodopseudomonas*, con aplicaciones biotecnológicas como la biorremediación y detoxificación de ambientes acuáticos (Egland et al., 1997).

Los grupos de organismos microaeróbicos y aerobios han desarrollado diversos mecanismos de protección de la nitrogenasa frente al oxígeno. Dentro del grupo de bacterias no fotosintéticas, los géneros más estudiados son *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Beijerinckia*. Estas bacterias, presentes en la rizosfera de plantas forrajeras y cultivos de interés agronómico pertenecen al grupo de las “rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal” (PGPR, plant growth-promoting rhizobacteria). *Azospirillum* es una α -proteobacteria que se encuentra frecuentemente en los alrededores y en la superficie de raíces de plantas cultivadas como maíz, arroz, trigo, cebada y avena, y se

sabe que interacciona con estas plantas de forma exógena, aportándoles nitrógeno fijado, fitohormonas y vitaminas, promoviendo de esta forma el crecimiento vegetal (Steenhoudt and Vanderleyden, 2000; Saharan and Nehra, 2011).

Las bacterias del género *Azotobacter* son capaces de fijar N_2 en condiciones aeróbicas, siendo de las más aerotolerantes que se conocen. Su adaptación al O_2 se debe, por un lado, a cambios en el contenido de determinados citocromos, que produce un incremento en la actividad respiratoria (protección respiratoria), y por otro lado, a la formación de complejos protectores entre la nitrogenasa y proteínas específicas que evitan su inactivación por el oxígeno (protección conformacional) (Madigan et al., 2003).

Algunas cianobacterias también son capaces de fijar N en condiciones aeróbicas o microaeróbicas. En condiciones limitantes de NH_4^+ , muchas especies filamentosas como *Nostoc* y *Anabaena* spp forman células diferenciadas llamadas heterocistos especializadas en la fijación de nitrógeno (Fay, 1992). Dichos heterocistos sufren en la expresión génica que permiten a estas especies llevar a cabo la fijación de nitrógeno y la fotosíntesis, simultáneamente pero en células distintas (Golden et al., 1985). Estos cambios llevan, entre otros, a un engrosamiento de la pared celular de los heterocistos, y a la eliminación del fotosistema II de la fotosíntesis, el sistema productor de oxígeno en los cloroplastos. Estas dos características les permiten mantener una concentración baja de oxígeno en el interior. Las células vegetativas llevan a cabo la fotosíntesis de forma similar a las plantas exportando azúcares a los heterocistos, los cuales, por su parte, exportan el N_2 fijado a las células vegetativas (Thomas, 1970; Aparicio-Tejo et al., 2000).

Las cianobacterias carentes de heterocistos fijan N_2 sólo en condiciones microaeróbicas (*Plectonema*, *Phormidium*), o bien pueden hacerlo en aerobiosis, pero separando temporalmente la fijación y la fotosíntesis en el ciclo día/noche (*Oscillatoria*, *Gloeotheca*). Así, durante el día tiene lugar la fotosíntesis y la nitrogenasa permanece inactiva; durante la noche, la respiración mantiene bajos los niveles de O_2 y la nitrogenasa se activa y utiliza la energía acumulada durante el día por la fotosíntesis (Madigan et al., 2003).

En términos evolutivos, se cree que la combinación entre la fijación biológica de N_2 y la fotosíntesis en cianobacterias debió ser un factor clave para el desarrollo de la vida en la Tierra, ya que los heterocistos se encuentran ya presentes en los primeros fósiles de organismos vivos que se conocen. Las cianobacterias son los organismos fijadores mayoritarios en ambientes acuáticos, tanto marinos como continentales, y la tasa de fijación en estas algas suele ser entre una y dos veces mayor que la de las bacterias no fotosintéticas de vida libre (Atlas and Bartha, 2002). En la actualidad se estima que la fijación de N_2 por cianobacterias representa alrededor de un tercio del total de la fijación biológica (Aparicio-Tejo et al., 2000).

Dentro de las arqueobacterias, sólo se han encontrado diazotrofos dentro del grupo de organismos metanogénicos, como *Methanosarcina* y *Methanococcus*, los cuales fijan N_2 mediante un mecanismo similar al de las bacterias (Leigh, 2000).

Tabla 1: Principales organismos fijadores de N_2 en vida libre

Tipo de microorganismo	Géneros
<u>Anaerobios</u>	
- Fotosintéticos	- <i>Allochrodatum</i> , <i>Thiopedia</i> , <i>Ectothiorhodospira</i>
- No fotosintéticos	- <i>Clostridium</i> , <i>Desulfovibrio</i> , <i>Desulfomaculum</i>
<u>Anaerobios facultativos</u>	
- Fotosintéticos	- <i>Rhodospirillum</i> , <i>Rhodopseudomonas</i>
- No fotosintéticos	- <i>Klebsiella</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Erwinia</i>
<u>Aerobios y microaeróbicos</u>	
- Fotosintéticos (cianobacterias)	- <i>Nostoc</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Gloethece</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Plectonema</i>
- No fotosintéticos	- <i>Azospirillum</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Azomonas</i> (PGPR)
<u>Arqueobacterias</u>	- <i>Metanococcus</i> , <i>Methanobacterium</i> , <i>Methanosarcina</i>

B.2. Simbiosis fijadoras con no leguminosas

Existen microorganismos que fijan N en simbiosis con no leguminosas, como *Frankia*, un actinomiceto capaz de formar asociaciones simbióticas con 170 especies de plantas de ocho familias de angiospermas, entre las cuales se incluyen especies leñosas como *Alnus* (aliso), *Casuarina* y *Myrica*, utilizadas en la industria maderera. La infección de la planta por *Frankia* da lugar a la formación de tumoraciones o

nódulos en las raíces llamadas actinorrizas. Estas asociaciones tienen gran importancia ecológica y forestal, ya que se utilizan en suelos pobres en N o en climas adversos, para mejorar la producción (Aparicio-Tejo et al., 2000). Además, muchas de estas plantas son capaces también de formar asociaciones micorrícicas, y esta triple simbiosis les confiere aún mayor ventaja para colonizar suelos marginales, siendo utilizadas de forma intensiva para prevenir la desertificación y repoblar áreas degradadas (Dawson, 2008; Santi et al., 2013). *Frankia* es capaz de fijar nitrógeno en ambientes aeróbicos, tanto en vida libre como en condiciones simbióticas, gracias a que protege la nitrogenasa confinándola en una vesícula de paredes gruesas que retardan la difusión del oxígeno, situada en el extremo de la célula.

Aunque generalmente se incluyen las cianobacterias entre los diazotrofos de vida libre, algunas pueden fijar nitrógeno en asociación con diferentes plantas y hongos (Tabla 2). Es el caso de la asociación entre el helecho acuático *Azolla* y la cianobacteria con heterocistos *Anabaena azollae*, usada durante siglos en los arrozales del sudeste asiático. Los helechos *Azolla* asociados con *Anabaena* se dejan crecer antes de plantar el arroz para enriquecer el suelo en nitrógeno y obtener una alta producción sin necesidad de usar fertilizantes nitrogenados (Meeks, 1998; Van Hove and Lejeune, 2002). Además, muchas especies de hongos, hepáticas, musgos, helechos, angiospermas y gimnospermas pueden establecer simbiosis fijadoras con estas algas procariotas. *Nostoc* y *Anabaena* se pueden asociar con hongos formando líquenes, con gimnospermas del género *Cycas* en sistemas radicales específicos (coraloides), formando estructuras similares a los nódulos, o con la angiosperma *Gunnera* en nódulos del tronco (Atlas and Bartha, 2002).

Además, se han aislado endófitos diazotrofos de raíces de gramíneas (tabla 2). Las bacterias endófitas penetran y viven en el interior de las raíces de las plantas, colonizando espacios intercelulares pero sin entrar en las células. Esto les confiere ventajas ecológicas respecto a las rizosféricas, ya que establecen un intercambio directo de metabolitos con la planta, no compiten con otros microorganismos del suelo por nutrientes (ya que son suministrados por la planta), y además están protegidas de estreses ambientales y patógenos (De Felipe, 2006). Algunos ejemplos son los géneros *Gluconacetobacter* y *Acetobacter* (endófitos de la caña de azúcar), *Azoarcus* y

Burkholderia (endófitos de arroz), *Azospirillum* y *Herbaspirillum* (Kennedy et al., 2004). Los diazotrofos endófitos de no leguminosas constituyen una fuente importante de N, que puede sustituir parcialmente la aplicación de urea en el cultivo del arroz y de otros cereales (Bhattacharjee et al., 2008). En países como Brasil se ha adoptado hace años la práctica agrícola de usar mezclas de varias especies endofíticas como inóculos en campo, lo cual permite mejorar el rendimiento de los cultivos (Boddey et al., 1995; Bhattacharjee et al., 2008).

Tabla 2: Principales microorganismos fijadores de N₂ en simbiosis con plantas no leguminosas

Tipo de organismo	Géneros	Hospedadores principales
<u>Actinomiceto</u>	<i>Frankia</i>	<i>Alnus, Casuarina, Myrica</i>
<u>Cianobacterias</u>	<i>Nostoc, Anabaena</i>	<i>Azolla (Anabaena)</i> , hongos, <i>Cycas, Gunnera</i>
<u>Endofitos</u>	<i>Gluconacetobacter</i> , <i>Acetobacter</i> <i>Azoarcus, Burkholderia</i> <i>Azospirillum, Herbaspirillum</i>	Caña de azúcar arroz Cebada, maíz y otras gramíneas

B.3. Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

La interacción que se da entre raíces de leguminosas y bacterias de la familia *Rhizobiaceae* es la una de las principales asociaciones mutualistas entre microorganismos y plantas y constituye la simbiosis fijadora de N₂ más conocida, con gran importancia para la agricultura, el medio ambiente y la economía mundiales. En suelos ricos en nitrógeno tanto las leguminosas como los rizobios son capaces de crecer y desarrollarse por separado, sin necesidad de asociarse; sin embargo, en condiciones limitantes de nitrógeno se produce un intercambio de señales entre ambos que da lugar a una estrecha simbiosis (Taiz and Zeiger, 2002). Los rizobios también son capaces de formar nódulos en tallos de algunas leguminosas, como *Sesbania* y *Aeschynomene*. Excepcionalmente, estas bacterias pueden fijar nitrógeno en asociación con plantas no leguminosas, como las pertenecientes a los géneros *Parasponia* y *Ulmaceae*.

Además, se han aislado cepas de *R. leguminosarum* biovar *trifolii* a partir de raíces de plantas de arroz, en campos donde hay una alternancia anual entre el cultivo del arroz y de tréboles (Yanni et al., 1997). Se ha demostrado en diversos estudios que la inoculación del arroz con estos rizobios provoca un incremento en el contenido de nitrógeno y la producción de grano, aunque no hay fijación de nitrógeno (Bhattacharjee et al., 2008 y referencias incluidas). Asimismo, se ha estudiado la capacidad de diversos rizobios para promover el crecimiento vegetal en especies hortícolas de gran interés agronómico como tomate, pimiento, lechuga, colza y rábanos, entre otros (García-Fraile et al., 2012 y referencias incluidas). Las cepas estudiadas en estos estudios, pertenecientes sobre todo a la especie *R. leguminosarum* promueven el crecimiento de estos cultivos cuando están presentes en la rizosfera como bacterias de vida libre, mediante mecanismos similares a los ya explicados para *Azospirillum* y otras PGPR, si bien no son capaces de fijar nitrógeno en estas condiciones.

En las simbiosis *Rhizobium*-leguminosa se produce la entrada de las bacterias a las raíces mediada por señales químicas, que causa un crecimiento tumoral de la raíz y da lugar a la formación de órganos especializados denominados nódulos. En el interior del nódulo las bacterias fijadoras sufren una serie de transformaciones y se especializan en la reducción del nitrógeno atmosférico. La fijación de nitrógeno en rizobios sólo tiene lugar en condiciones simbióticas, ya que en el interior del nódulo se genera el ambiente microaeróbico necesario para el funcionamiento de la nitrogenasa (Atlas and Bartha, 2002). La presencia de nódulos fijadores en raíces de leguminosas se ha observado desde hace siglos, y en 1890 W. Beijerinck fue el primero el aislar y cultivar bacterias a partir de nódulos, concretamente a partir de *Vicia faba*, denominando *Bacillus radicícola* a la bacteria aislada. En la misma época, B. Frank sugirió el término *Rhizobium* seguido del nombre de la leguminosa hospedadora para designar nombres científicos a estos microorganismos, nomenclatura que continúa en uso hoy en día. El término rizobios o “rhizobia” se emplea frecuentemente en un sentido amplio para definir bacterias del suelo que establecen asociaciones simbióticas con plantas induciendo tumoraciones (Sprent, 2001).

B.3.1. Clasificación taxonómica de los rizobios

Hasta hace poco los rizobios se clasificaban atendiendo a sus características morfológicas o fisiológicas, no obstante la división taxonómica actual está basada en la filogenia de genes “housekeeping” o de expresión constitutiva y la similitud de genomas completos. Desde el año 1996 la clasificación y caracterización molecular se basa sobre todo en el análisis comparativo de secuencias de genes que codifican para el ARN ribosómico 16S (Young and Haukka, 1996). El desarrollo actual de las técnicas moleculares y de secuenciación hace que esta clasificación esté en constante cambio, añadiéndose y renombrándose de forma regular nuevas especies de rizobios en las dos principales bases de datos especializadas en la filogenia, taxonomía y diversidad de la familia *Rhizobaceae*: la del Subcomité para la Taxonomía de *Rhizobium* y *Agrobacterium* del Centro de Ciencias Genómicas (CCG, UNAM, Cuernavaca, Mexico) (<http://edzna.ccg.unam.mx/rhizobial-taxonomy>; última actualización: octubre 2012), y la de Bevan Weir (Auckland, Nueva Zelanda) (<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>; última actualización: mayo 2013).

Los rizobios son bacilos Gram-negativos no esporulados pertenecientes al grupo de las Proteobacterias, en el que se incluyen *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* como los principales géneros. Hasta hace relativamente poco, las clasificaciones taxonómicas dividían a los rizobios en tres ramas de la subclase α -2 de las Proteobacterias (Young and Haukka, 1996). Posteriormente se añadió una cuarta rama para incluir la bacteria metilotrófica *Methylobacterium*, tras descubrir que era capaz de establecer simbiosis con leguminosas del género *Crotalaria* (Sy et al., 2001). Además, Moulin et al. (2001) y Vandamme et al. (2002) describieron la infección y nodulación de leguminosas por bacterias del género *Burkholderia*, pertenecientes a la subclase β de las Proteobacterias. Además de *Burkholderia*, se han aislado de nódulos de *Mimosa* spp hasta 8 cepas de *Ralstonia* (posteriormente renombrada como *Cupriavidus*) también clasificada como β -proteobacteria (Chen et al., 2001). Desde entonces, se han descubierto muchas otras especies y cepas de β -proteobacterias capaces de inducir la formación de nódulos fijadores en leguminosas, pertenecientes a los géneros *Burkholderia*, *Cupriavidus* y *Herbaspirillum*. Los principales centros de diversidad de

estas bacterias se hallan en zonas tropicales, sobre todo Brasil y Sudáfrica, y se han aislado de una amplia diversidad de especies de mimosas. En los últimos años se han aislado cepas de *Burkholderia*, pertenecientes sobre todo a las especies *B. phymatum* y *B. tuberum* a partir de nódulos de mimosas (Gyaneshwar et al., 2011 y referencias incluidas) y recientemente se han encontrado cepas de *Burkholderia* específicas de especies de leguminosas endémicas de Sudáfrica pertenecientes a los géneros *Hypocalyptus* y *Cyclopia* (Beukes et al., 2013). Además, *Burkholderia* es capaz de nodular leguminosas de otros géneros como *Acacia*, *Piptadenia* (Bornaud et al., 2013), *Aspalathus* (rooibos) (Hassen et al., 2012) e incluso *Phaseolus* y *Sorghum* (Wong-Villareal et al., 2012; Gyaneshwar et al., 2011).

La especificidad del hospedador varía enormemente dependiendo de cada simbiosis. Por ejemplo, el género *Rhizobium* incluye cepas como *Rhizobium* sp. NGR234 con el mayor rango de plantas hospedadoras descrito hasta la fecha, ya que es capaz de nodular hasta 375 especies de leguminosas (Pueppke and Broughton, 1999); dentro del mismo género, sin embargo, existen cepas y biovars muy específicos como *R. leguminosarum* bv *trifolii* y *R. leguminosarum* bv *viciae* (Spaink et al., 1989). Del mismo modo, la capacidad de las plantas hospedadoras para establecer simbiosis con diferentes rizobios presenta grandes variaciones dependiendo del tipo de leguminosa: hay especies de leguminosas con una alta especificidad para la bacteria huésped y sólo se asocian con una especie y cultivar específicos, y sin embargo las leguminosas de la tribu Phaseolae presentan una gran versatilidad para la asociación con diferentes especies y géneros de rizobios (Michiels et al., 1998). Esto hace que el género *Phaseolus* pueda infectado por una gran variedad de especies pertenecientes al género *Rhizobium*, mientras que el guisante (*Pisum sativum*) sólo puede establecer simbiosis con la especie *R. leguminosarum*, y únicamente con su biovar correspondiente (*viciae*). La clasificación actual de las principales especies de rizobios así como sus hospedadores específicos se esquematizan en la tabla 3.

Tabla 3: Clasificación actual de los rizobios, principales géneros y especies y leguminosas hospedadoras

Género	Principales especies	Leguminosas hospedadoras
α – PROTEOBACTERIAS		
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine max</i> (soja), <i>G. soja</i> (soja silvestre)
<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i> (garbanzo)
	<i>M. loti</i>	<i>Lotus japonicum</i> , <i>L. corniculatus</i>
<i>Sinorhizobium</i> (<i>Ensifer</i>)	<i>S. fredii</i>	<i>G. max</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> (judía), <i>Vigna radiata</i> , <i>V. unguiculata</i> , <i>Cajanus</i>
	<i>S. medicae</i>	<i>Medicago</i> spp.
	<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago truncatula</i> , <i>M. sativa</i> (alfalfa), <i>Trigonella</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>R. etli</i>	<i>P. vulgaris</i> (judía)
	<i>R. tropici</i>	<i>P. vulgaris</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Onobrychis</i>
	<i>R. leguminosarum</i> <ul style="list-style-type: none"> ○ Biovar <i>trifolii</i> ○ Biovar <i>viciae</i> ○ Biovar <i>phaseoli</i> 	<i>Trifolium</i> <i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i> , <i>Pisum</i> , <i>Vicia</i> <i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulodinans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
β – PROTEOBACTERIAS		
<i>Burkholderia</i>	<i>B. mimosarum</i>	<i>Mimosa</i>
	<i>B. phymatum</i>	<i>Mimosa</i>
<i>Cupriavidus</i>	<i>C. taiwanensis</i>	<i>Mimosa</i>

B.3.2. El género *Rhizobium*

El género *Rhizobium* es el que presenta mayor diversidad dentro de la familia Rhizobaceae, agrupando 22 especies, clasificadas en base a criterios moleculares como la secuenciación del gen 16S y otras características fisiológicas y genéticas (tabla 3). La especie *Rhizobium leguminosarum* se subdivide en “biovars”, dependiendo de la especie de leguminosa con la que establezcan simbiosis. Debido a un fenómeno de co-evolución entre algunas asociaciones simbióticas *Rhizobium*-leguminosa, cada *biovar* infecta específicamente una especie o unas pocas especies. *R. leguminosarum* se subdivide en los biovars *trifolii*, *phaseoli* o *viciae*. El biovar *trifolii* infecta el género *Trifolium* (trébol), y el biovar *phaseoli*, el género *Phaseolus* (alubia), mientras que el

biovar *viciae* puede infectar plantas de los géneros *Vicia*, *Pisum* y *Lens* (judía, guisante y lenteja) (Tabla 3). Los tres biovares son genéticamente similares, pero al aislarlos se ha comprobado que difieren en número de plásmidos, tamaño y compatibilidad de hospedador (Laguerre et al, 1992; Palmer and Young, 2000).

El plásmido Sym (simbiótico) es el que determina la nodulación de un biovar concreto en plantas de uno o varios géneros de forma específica, ya que tanto los genes relacionados con la nodulación (genes nod) como los relacionados con la fijación de nitrógeno (genes nif) se encuentran en éste plásmido. La similitud genética entre biovares se refleja por el hecho de que una cepa a la que se le haya quitado su propio plásmido Sym y se le haya introducido el plásmido Sym de otro biovar por conjugación es capaz de nodular las especies de leguminosas específicas de ese biovar (White, 2006). La pérdida del plásmido simbiótico, por tanto, conduce a la pérdida de la capacidad simbiótica.

B.3.3. Establecimiento de la simbiosis: formación del nódulo

La formación del nódulo es el resultado de alteraciones morfológicas en los pelos radicales de las leguminosas, inducidas por un complejo intercambio de señales químicas entre los rizobios presentes en el suelo y la leguminosa hospedadora. El pelo radical es una extensión que se forma en algunas células de la epidermis de la raíz que aumenta la superficie celular y por tanto la absorción de nutrientes y agua (Taiz and Zeiger, 2002). A continuación se explican con detalle las fases de formación de un nódulo.

B.3.3.1. Reconocimiento entre los simbios: flavonoides y factores Nod

La comunicación entre los simbios comienza con la liberación por parte de la planta de una serie de compuestos contenidos en sus exudados de semilla y raíz, principalmente flavonoides, ácidos aldónicos y betaínas (Atlas and Bartha, 2002). Estas moléculas son liberadas por la planta en condiciones limitantes de nitrógeno en el suelo, y ante otros estreses ambientales y cada especie de leguminosa exuda un conjunto característico de flavonoides, lo cual determina en parte la especificidad de algunas simbios (Perret et al., 2000). La población de rizobios de vida libre

compatibles con la planta presentes en el suelo se multiplica en las proximidades de la raíz y migra hacia la superficie radical, atraída por los flavonoides mediante un fenómeno de quimiotaxis (Taiz and Zeiger, 2002). Al mismo tiempo, los compuestos excretados por la planta inducen en las bacterias la síntesis de las moléculas responsables de la nodulación, denominadas factores Nod (figura 2) (Denarié et al., 1996). Los factores Nod son lipoquitooligosacáridos, moléculas complejas con una estructura básica formada por un N-oligosacárido (con una longitud de 3 a 5 monómeros de N-acetilglucosamina), al que se une un ácido graso en el grupo amino del azúcar del extremo no reductor. La síntesis de este esqueleto básico depende de tres genes, *nodA*, *nodB* y *nodC*, los cuales son comunes a casi todas las especies de rizobios, con una secuencia bastante conservada (Gibson et al., 2008). Además, sobre esta estructura básica de factor Nod, se añaden grupos o sustituciones a la cadena principal de oligosacárido, dando una amplia variedad de factores Nod con estructuras bioquímicas distintas, que constituyen la principal causa de la especificidad de hospedador de los rizobios (Long, 1996). Una misma especie de rizobio puede secretar uno o varios tipos de factores Nod, y por ejemplo las especies con amplio rango de hospedador puede llegar a producir hasta 60 tipos distintos de factores Nod. Los sustituyentes o grupos pueden ser fucosas, sulfatos, acetilos, etc., y la adición de estos grupos al esqueleto básico del factor Nod depende de los llamados “genes *nod* de hospedador” (host-specific *nod* genes) (Taiz and Zeiger, 2002). La longitud del ácido graso unido al extremo no reductor, así como su grado de saturación también varían según el factor Nod y la especie de rizobio, y también son determinantes de especificidad.

B.3.3.2. Adhesión a las raíces y transducción de señales

La adhesión de los rizobios a las células con pelos radicales tiene lugar a través de las fibrillas de celulosa de la planta y de las adhesinas bacterianas; además, intervienen otras moléculas, como los lipopolisacáridos de la pared bacteriana y los flagelos de los rizobios, y también otros compuestos exudados por las raíces como glicoproteínas (Althabegoiti, 2010). Las lectinas son proteínas vegetales presentes en el pelo radical, con dominios de unión a azúcares que reconocen polisacáridos específicos

de superficie de los rizobios, facilitando la adhesión (van Rhijn et al., 1998). Se creía que las lectinas eran los receptores específicos para los factores Nod (van Rhijn et al., 1998). Posteriormente, sin embargo, se descubrieron dos receptores de membrana de tipo LysM, con dominios intercelulares con actividad quinasa, con una alta afinidad por N-glucosamina, y se observó que las mutaciones en estos receptores afectan a la percepción de factores Nod (Radutoiu et al., 2003; Limpens et al., 2003). Además, se ha demostrado que la especificidad de los factores Nod en las simbiosis rizobio-leguminosa es debida a estos receptores (Radutoiu et al., 2007).

La formación de un nódulo implica dos procesos de desarrollo en diferentes tejidos de la planta: infección bacteriana, en las células de la epidermis, y organogénesis de nódulo, que tiene lugar en las capa de células corticales bajo la epidermis (figura 2). Ambos procesos deben estar perfectamente coordinados para asegurar que la organogénesis de nódulo tiene lugar en el sitio exacto de la infección bacteriana (Oldroyd et al., 2011). Dicha coordinación es posible gracias a las complejas cascadas de señalización que siguen a la percepción de los factores Nod por los receptores LysM de la membrana de las células de la epidermis. Al unirse al factor Nod, el dominio intracelular del receptor se fosforila, y esta señal es transducida al interior celular y a las células del cortex (Oldroyd and Downie, 2008).

La fosforilación del receptor LysM induce la despolarización de canales de calcio en la membrana celular vegetal, causando oscilaciones o “picos” en la concentración de calcio intracelular, conocidas como “calcium spiking” (Ehrhardt et al., 1996). Estudios posteriores demostraron que el fenómeno de “calcium spiking” es necesario para la transducción de señales que dan lugar al nódulo (Catoira et al., 2000; Shaw and Long, 2003; Oldroyd and Downie, 2004). La señal de “calcium-spiking” es percibida por una protein-quinasa dependiente de calcio/calmodulina (CCaMK), que activa la expresión de genes requeridos para la nodulación en las células de la epidermis (Mitra et al, 2004; Oldroyd and Downie, 2008). Al mismo tiempo, CCaMk transduce la señal a las células del cortex para dar lugar al primordio de nódulo (Oldroyd et al, 2011).

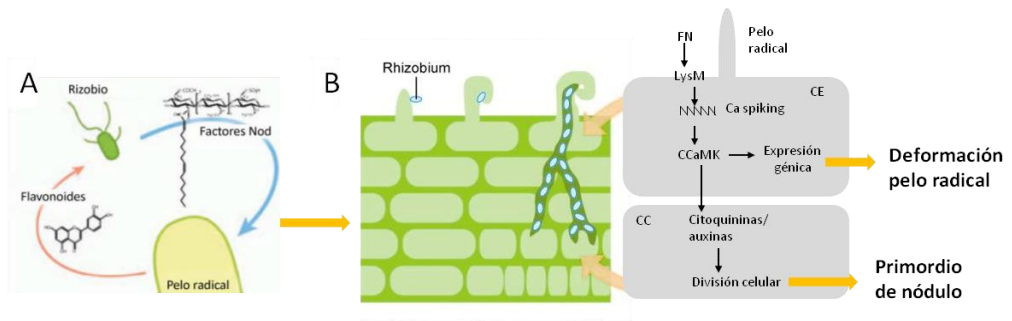


Figura 2: resumen de las primeras fases de formación de un nódulo: A: reconocimiento entre simbiontes; B: transducción de señales en las células de la epidermis (CE) y células del córtex (CC). FN: Factor Nod. Adaptado a partir de Oldroyd and Downie (2008), y de Gibson et al. (2008).

B.3.3.3. Infección de la raíz y formación del primordio de nódulo

La entrada de las bacterias en la raíz se produce principalmente a través de los llamados “cordones de infección”, formados a partir del pelo radical de las células de la epidermis en respuesta a los factores Nod (figura 3). En cada una de estas células tiene lugar un reordenamiento del citoesqueleto y un cambio en la dirección del crecimiento del pelo radical, el cual se curva hasta invaginarse sobre sí mismo y atrapar a los rizobios adheridos a su superficie (Cardenas et al., 1998) (figura 2). La pared vegetal del pelo radical es degradada por la acción de enzimas procedentes tanto de la propia planta como los rizobios, sobre todo celulasas (Oldroyd et al., 2011). Las bacterias, entonces, penetran al interior de la célula vegetal a través del interior del cordón de infección, formado por vesículas del Golgi de la célula vegetal.

Paralelamente a la infección, en las células del córtex se está formando el primordio del nódulo (Oldroyd and Downie, 2008). Este proceso está controlado principalmente por hormonas vegetales, sobre todo el balance entre auxinas y citoquininas, que se altera de forma local en la zona del córtex cercana al punto de infección. El origen más probable de esta alteración hormonal es la señal iniciada por los factores Nod en las células de la epidermis, que se transduce a las células corticales por mecanismos de señalización célula-célula (Ferguson et al., 2010). Se ha sugerido también que los flavonoides sintetizados por los rizobios que están entrando en la raíz pueden alterar el flujo de auxinas, que a su vez modula la concentración de citoquininas (Oldroyd and Downie, 2008; Mathesius, 2001).

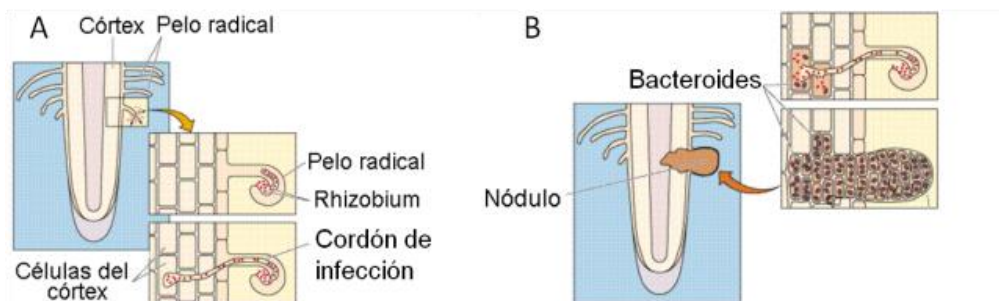


Figura 3: formación de un nódulo II: A: curvatura del pelo radical y formación del cordón de infección; B: liberación de las bacterias en vesículas en células del córtex y maduración del nódulo. Modificada a partir de Purves et al. (1995)

B.3.3.4. Organogénesis y maduración del nódulo. Tipos de nódulos

El cordón de infección, dentro del cual se dividen y avanzan las bacterias, crece a través del pelo radical hasta alcanzar la zona del córtex donde se está generando el primordio de nódulo (Figura 3A). Una vez allí, el cordón de infección se ramifica y entra en las células corticales, liberando las bacterias dentro de vesículas en el interior de estas células mediante fenómenos de endocitosis (figura 3B) (Gage, 2004). Así, los rizobios quedan englobados en el citoplasma de las células corticales, rodeadas por dos membranas: su propia membrana bacteroidal y la membrana peribacteroidal (MPB) o del simbiosoma, derivada del cordón de infección y de la membrana plasmática de la célula del córtex. Se denomina simbiosoma al conjunto de bacterias englobadas por una misma membrana peribacteroidal, y según el tipo de nódulo, pueden englobar una o varias bacterias (Terpolilli et al., 2012). Las células del córtex que forman el primordio de nódulo siguen dividiéndose en dirección perpendicular a la raíz y se rodean de tejido vascular procedente de la misma. A medida que las bacterias crecen y avanzan a lo largo del cordón de infección acumulan grandes cantidades de polihidroxibutirato (PHB) en forma de gránulos visibles al microscopio (Prell and Poole, 2006). Estas reservas de PHB aseguran el suministro de carbono a las bacterias necesario para su crecimiento en el interior de la planta y su diferenciación hasta bacteroides.

Atendiendo a su patrón de desarrollo, morfología, y fisiología, los nódulos se clasifican en determinados e indeterminados (figura 4). Los nódulos determinados son

característicos de leguminosas tropicales como *Phaseolus* o *Glycine*, aunque también se forman en leguminosas de clima templado como *Lotus*. La característica principal de los nódulos determinados es su forma redondeada, debido a la presencia de un meristemo apical no permanente, procedente de la zona externa o media del cortex radical (Terpolilli et al., 2012). Esto da lugar a nódulos formados por una mezcla homogénea de células infectadas y no infectadas por bacterias. Los nódulos determinados no presentan una estructura definida, y la fijación de nitrógeno tiene lugar por todo el nódulo. La senescencia ocurre del interior al exterior del nódulo: las células infectadas más jóvenes y las no infectadas están inmediatamente debajo del tejido periférico (figura 4), las células con simbiosomas funcionales se encuentran en una capa intermedia y los que poseen simbiosomas senescentes se localizan en la zona central. (Gage et al., 2004).

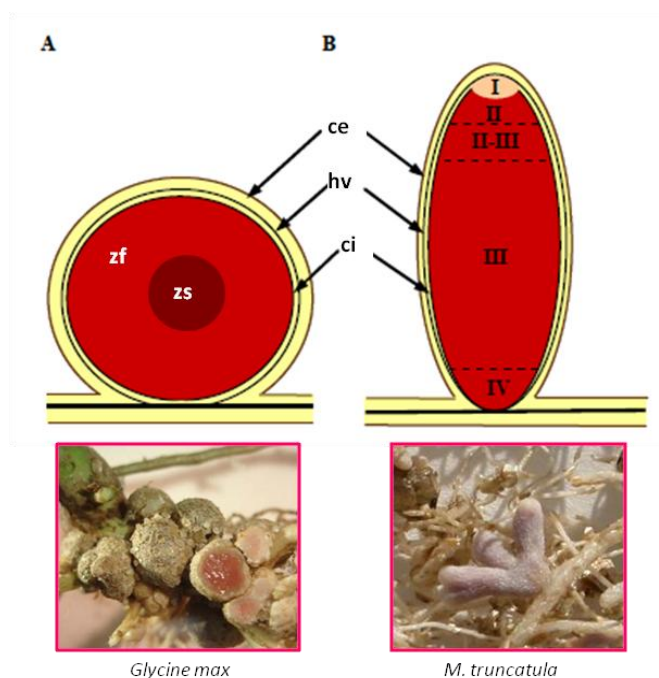


Figura 4: morfología de un nódulo determinado (A), como los de soja, y de un nódulo indeterminado (B), como los de *M. truncatula*. zf: zona activa de fijación; zs: zona de senescencia; ce: cortex externo; hv: haces vasculares; ci: cortex interno. Basado en Larrainzar (2009). Fotos: Penn State University y E. Larrainzar, respectivamente.

Por el contrario, los nódulos indeterminados, formados en general en leguminosas de clima templado como *Pisum*, *Medicago*, o *Vicia* se originan a partir de

la capa interna de células del córtex radical y se caracterizan por un meristemo apical persistente o permanente, con un gradiente definido de desarrollo que da lugar a cuatro zonas principales dentro del nódulo (figura 4). De la parte apical del nódulo al punto de unión con la raíz, estas zonas son: zona I o apical, donde se localiza el meristemo, zona II o de infección, donde las bacterias son liberadas del cordón de infección e infectan las células vegetales diferenciándose hasta bacteroides en esta área, zona III o de fijación, en la cual tiene lugar la fijación de nitrógeno por los bacteroides completamente diferenciados, y, en nódulos maduros, zona IV o de senescencia, en el punto de contacto con la raíz.

B.3.3.5. Diferenciación de los rizobios a bacteroides

Una vez dentro del simbiosoma, los rizobios sufren profundas modificaciones en su metabolismo y morfología que conducen a una diferenciación a un nuevo estadio denominado bacteroide, especializado en la fijación de nitrógeno. El proceso de diferenciación y los tipos de bacteroide varían ligeramente según se produzca en nódulos determinados o indeterminados, aunque las modificaciones principales son comunes a ambos tipos de nódulos: expresión de genes *fix* y *nif*, relacionados con la fijación de nitrógeno, represión de genes relacionados con la movilidad y cambios en el metabolismo del carbono y nitrógeno (Becker et al., 2004).

En nódulos determinados, los simbiosomas albergan dos o más bacteroides de tamaño y forma similar a las bacterias de vida libre de las que proceden, y son capaces de desdiferenciarse y crecer en vida libre tras ser aislados del nódulo. En cambio, los simbiosomas de nódulos indeterminados contienen en general un solo bacteroide cada uno, de forma y tamaño diferentes a las bacterias de vida libre. Además, los bacteroides de nódulos indeterminados, no son capaces de recuperar su forma de vida libre y crecer de forma aislada una vez diferenciados. Esto es debido al fenómeno de endoreduplicación del genoma que tiene lugar en bacteroides de nódulos indeterminados (Lodwig et al., 2005; Terpolilli et al., 2012). La endoreduplicación consiste en sucesivos ciclos de duplicación del genoma sin que exista división celular que lleva los bacteroides a albergar hasta 24 copias del genoma que tenía en condiciones de vida libre, como es el caso de bacteroides de *S. meliloti* aislados de *M.*

truncatula (Mergaert et al., 2006). La endorreduplicación, inducida por la planta, origina una hinchazón o abultamiento (“swelling”) en bacteroides de nódulos indeterminados, que provoca cambios en la morfología y tamaño del bacteroide. Según demuestran varios estudios, los bacteroides hinchados (“swollen”) son incapaces de desdiferenciarse, denominándose “bacteroides a término” (Terpolilli et al., 2012 y referencias incluidas). Los bacteroides de algunas plantas con nódulos determinados como *Arachis* (cacahuete) también sufre endorreduplicación y swelling, y en algunos nódulos indeterminados como los de *Cicer* no se producen estos fenómenos (Oono et al., 2010).

El fenómeno de endorreduplicación y swelling se ha estudiado sobre todo leguminosas de clima templado con nódulos indeterminados como *Medicago*, *Pisum*, *Trifolium* y *Vicia*, pertenecientes al clado IRLC (inverted-repeat-lacking clade), dentro de la subfamilia Papilionoideae. En nódulos de algunas de estas plantas se han detectado un grupo heterogéneo de péptidos ricos en cisteína con actividad antimicrobiana, denominados péptidos NCR (nodule cysteine rich) (Terpolilli et al., 2012; Udvardi and Poole, 2013, y referencias incluidas), ausentes en nódulos determinados, que son capaces de inducir endorreduplicación en los bacteroides en desarrollo. Esto se ha demostrado al añadir péptidos NCR a células de vida libre de *S. meliloti* y observar que provocaban en ellas endorreduplicación, hinchamiento y otras características de la diferenciación a bacteroide (Van de Velde et al., 2010). Además, cuando uno de estos NCR se expresaba en *Lotus japonicum* (leguminosa con nódulos determinados, dentro del clado IRLC, pero que no produce péptidos NCR), los bacteroides se hinchaban y se comportaban en general como los bacteroides de nódulos indeterminados (Van de Velde et al., 2010).

Los bacteroides diferenciados en el interior de la célula vegetal de un nódulo les comportan como orgánulos vegetales o amonioplastos, especializados en la fijación de nitrógeno y totalmente dependientes de la planta para obtener las fuentes de carbono. Esto se hace más patente aún en bacteroides de nódulos indeterminados, ya que en ellos tiene lugar la represión de los genes responsables del ciclo celular y síntesis de ADN, proteínas ribosomales y peptidoglicano (Karunakaran et al., 2009). Paradójicamente, también pierden la capacidad para asimilar amonio en aminoácidos,

justo en el momento en que se activa la fijación de nitrógeno y por tanto la síntesis de amonio (Patriarca et al., 2002). Esta situación les hace ser dependientes del suministro de aminoácidos por parte de la planta (auxótrofos), en particular, aminoácidos de cadena ramificada, como se ha demostrado en plantas de guisante inoculadas con cepas de *R. leguminosarum* mutantes en los transportadores de aminoácidos *aap* y *bra* (Lodwig et al., 2003; Prell et al., 2010). Este fenómeno se denominó “auxotrofia simbiótica”, ya que sólo se da cuando *R. leguminosarum* está en forma de bacteroide. La auxotrofia simbiótica es independiente del tipo de nódulo o de la presencia de péptidos NCR, ya que también se ha observado en *P. vulgaris*; por el contrario, en bacteroides procedentes de nódulos indeterminados de *M. sativa* (alfalfa), no se han observado signos claros de auxotrofia simbiótica (Prell et al., 2010)

En estas plantas parece que la evolución de las simbiosis rizobio-leguminosa, de aparición relativamente reciente, ha avanzado hacia una situación de endosimbiosis obligada, en la cual los bacteroides han evolucionado, o están evolucionando hacia amonioplastos, orgánulos especializados en la reducción del nitrógeno atmosférico.

B.3.3.6. Activación de la fijación de nitrógeno

En la diferenciación a bacteroide se activan los genes *nif* y *fix*, necesarios para la fijación. Se denominan genes *nif* a los genes relacionados con la fijación comunes a todos los diazotrofos, mientras que los genes *fix* son los que se activan sólo en organismos que fijan en simbiosis. Dada la alta sensibilidad de la nitrogenasa por el oxígeno, la inducción de los genes *nif* y *fix* está controlada por la concentración de oxígeno en el interior del bacteroide. El mecanismo de activación de los genes *nif* y *fix* varía considerablemente entre especies de rizobios e incluso entre cepas de la misma especie (Udvardi and Poole, 2013), pero el mecanismo común consiste en la activación de una proteína que actúa como sensor de oxígeno, FixL, que se fosforila a concentraciones bajas de oxígeno (entre 5 y 30 nM) (Terpolilli et al., 2012). La fosforilación de FixL inicia una cadena de señalización que activa otros genes *fix* y los genes *nif*, encargados de la síntesis de todos los componentes de la nitrogenasa, a excepción del componente homocitrato, sintetizado por la planta. Los diazotrofos de vida libre contienen el gen necesario para la síntesis de homocitrato, ausente en los

rizobios que sólo fijan en simbiosis, lo cual constituye una evidencia más de que la planta adquiere el control total sobre el metabolismo de los bacteroides, regulando su tasa de fijación de nitrógeno mediante el suministro del homocitrato, necesario para el funcionamiento de la nitrogenasa (Terpolilli et al., 2012).

C. METABOLISMO NODULAR

C.1. Nitrogenasa

La reducción de nitrógeno atmosférico en nódulos es catalizada por el complejo enzimático nitrogenasa de los bacteroides, exclusiva de procariotas y con una estructura y funcionamiento comunes a casi todos los diazotrofos. El complejo consta de dos metaloproteínas, codificadas por los genes *nif* (figura 5):

- La dinitrogenasa reductasa, también llamada Fe-proteína o componente II es una ferrosulfoproteína de 30 a 62 kDa dependiendo del organismo, codificada por el gen *nifH*. Consta de dos subunidades idénticas con un centro catalítico en el sitio de unión entre ellas con un clúster 4Fe-4S. Además, poseen dos sitios de unión a Mg-ATP (uno en cada subunidad). La sensibilidad al oxígeno de la nitrogenasa se debe a la rápida inhibición del transporte de electrones de esta Fe-proteína en presencia de oxígeno (Taiz and Zeiger, 2002)
- La dinitrogenasa (componente I o FeMo-proteína) es un tetrámero de entre 180 y 240 KDa (dependiendo de la especie) compuesto por dos subunidades de tipo α y dos de tipo β , codificadas respectivamente por los genes *nifD* y *nifK*. Cada par $\alpha\beta$ contiene un cofactor de hierro y molibdeno (FeMoco), con una estructura molecular $\text{MoFe}_7\text{S}_9\text{:homocitrato}$. Los cofactores de las dos subunidades forman los centros activos de la nitrogenasa donde tiene lugar la reducción de nitrógeno molecular a amonio. Los sitios de unión entre las subunidades α y β contienen además un grupo Fe-7S, denominado P-cluster, que también participa en la reacción enzimática (Smith, 2002; White, 2005). Esta proteína también es inactivada por el oxígeno, pero no tan rápido como la dinitrogenasa reductasa (Taiz and Zeiger, 2002).

El mecanismo básico de funcionamiento de la nitrogenasa implica varias reacciones acopladas de óxido-reducción de los componentes de la nitrogenasa, y requiere gasto de energía en forma de ATP. Además, también interviene otra ferrosulfoproteína llamada ferredoxina, que es la que inicia la cadena de reacciones redox. El proceso tiene lugar en 4 pasos secuenciales (figura 5):

- 1) Oxidación de la ferredoxina y reducción de la Fe-proteína (dinitrogenasa reductasa) por los electrones derivados de la oxidación de la ferredoxina.
- 2) Cambio conformacional de la Fe-proteína provocado por la unión de dos moléculas de MgATP, que hace que la Fe-proteína se asocie con la FeMo-proteína.
- 3) Oxidación de la Fe-proteína y transferencia de los electrones derivados de la oxidación entre los dos componentes de la nitrogenasa. Esta reacción está acoplada a la hidrólisis de ATP y provoca la reducción de la FeMo-proteína y la disociación entre los dos componentes. La transferencia de cada electrón requiere la hidrólisis de dos moléculas de MgATP a ADP como mínimo.
- 4) Unión de la molécula de N_2 a la dinitrogenasa en su centro activo, el cofactor de hierro-molibdeno, y reducción hasta NH_3 gracias al poder reductor generado en las anteriores reacciones.

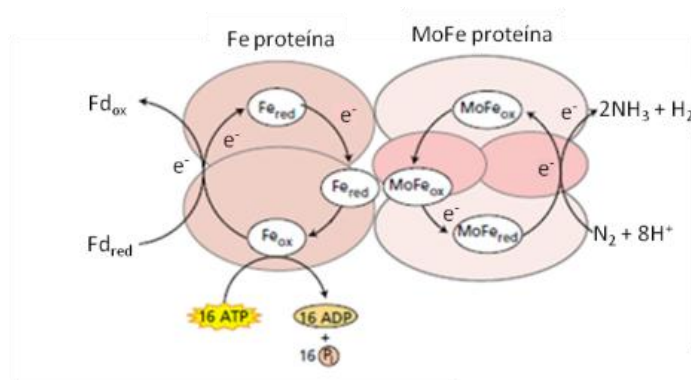
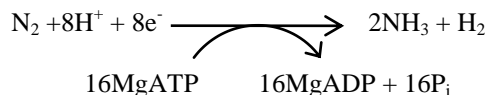


Figura 5: esquema y funcionamiento del complejo nitrogenasa (adaptado de Taiz and Zeiger, 2002). Fd: ferredoxina; Fe-proteína: ferroproteína (dinitrogenasa reductasa); FeMo proteína: ferromolibdoproteína (dinitrogenasa).

Para romper el triple enlace covalente de la molécula de N_2 atmosférico y reducirlo hasta dos moléculas de NH_3 se necesitan 8 electrones y 8 protones, por lo que los pasos 1 a 3 se repiten 8 veces hasta acumular el poder reductor y los electrones

suficientes para llevar a cabo la reacción. La acumulación de 8 electrones conlleva, por tanto, la hidrólisis de 16 moléculas de ATP, lo que explica el alto coste energético de esta reacción. La estequiometría completa de la reacción de la nitrogenasa es:



Como se observa en la reacción, la reducción de una molécula de nitrógeno atmosférico por la nitrogenasa está acompañada de la formación de una molécula de hidrógeno como subproducto de la reducción de protones sobrantes. Esta producción de hidrógeno supone una limitación importante para la fijación de nitrógeno, que reduce la eficiencia de la nitrogenasa hasta en un 25% (Philips, 1980) y supone una fuente de ineficiencia energética para los diazotrofos, especialmente para los organismos que viven en simbiosis con leguminosas. La mayoría de los rizobios liberan el H_2 al exterior como subproducto de la reacción al no poder metabolizarlo (cepas hup^-). Sin embargo, algunas cepas son capaces de reciclar el hidrógeno gracias al enzima hidrogenasa (cepas hup^+), que recicla el hidrógeno producido y lo reoxida para producir agua, recuperando parte del poder reductor utilizado en la reacción de la nitrogenasa, y mejorando su eficiencia energética (Brito et al., 2005).

C.2. Mecanismos de control del flujo de oxígeno

El complejo nitrogenasa es extremadamente sensible al oxígeno, ya que los centros catalíticos de las dos ferrosulfoproteínas que lo forman se inactivan por oxidación de forma irreversible. Sin embargo, el oxígeno es necesario para obtener la energía (en forma de ATP) requerida para reducir el nitrógeno atmosférico a amonio, como se ha visto y la obtención de tanta energía sólo es posible mediante la respiración aeróbica. Por ello, los nódulos han desarrollado diversos mecanismos para regular la concentración de oxígeno de forma muy estricta, de manera que dicha concentración sea la suficiente para mantener la tasa respiratoria en los bacteroides, pero sin inactivar la nitrogenasa. Esto se consigue gracias a la presencia de una barrera a la difusión de oxígeno, a una proteína presente en las leguminosas con afinidad por el oxígeno, llamada leghemoglobina, y a las oxidasas terminales de los bacteroides (Denison,

1992). Además, tanto los bacteroides como las mitocondrias vegetales mantienen altas tasas de respiración y consumen rápidamente el oxígeno que está entrando en el nódulo (Udvardi and Poole, 2013).

C.2.1. Barrera a la difusión de oxígeno

La entrada de oxígeno a la zona central del nódulo infectada por los bacteroides está regulada por una resistencia a la difusión del oxígeno, desarrollada en la capa de células del córtex interno nodular, detectada tanto en nódulos determinados de soja (Tjepkema and Yocum, 1974) como en nódulos indeterminados de guisante (Witty et al., 1987). La resistencia variable a la difusión de oxígeno puede estar controlada por diversos mecanismos:

- por variaciones en la concentración de determinados osmolitos que determinan osmóticamente la entrada o salida de agua de las células adyacentes (Purcell and Sinclair, 1994)
- presencia de células osmocontráctiles en el córtex interno nodular, similares a las de los estomas de las hojas, sugiriendo que el control de la conductancia de oxígeno en los nódulos se lleva a cabo mediante intercambios reversibles de agua intercelular. Esta hipótesis se ha confirmado por una abundante presencia de acuaporinas (transportadores de agua) en la membrana del tonoplasto de estas células, denominadas TIPs (tonoplast intrinsic proteins) (Wei and Layzell, 2006)
- consumo de oxígeno en la endodermis o córtex interno, asociado a la presencia de altos niveles de antioxidantes. (Dalton et al., 1998).
- presencia de glicoproteínas localizadas en los espacios intercelulares del córtex nodular (James et al., 2000).

C.2.2. Leghemoglobina

La leghemoglobina (Lb) es una proteína monomérica similar a la hemoglobina humana, ya que contiene un grupo prostético con centros de hierro con alta afinidad por el oxígeno (grupo hemo). Constituye la proteína de origen vegetal más abundante en nódulos (hasta un 30% respecto al total de proteínas) y tiene un tamaño de 16 kDa, con un grupo hemo de tipo protoporfirina IX que se enlaza de forma reversible con el

oxígeno. La presencia de hierro en la leghemoglobina y la gran abundancia de esta proteína en nódulos fijadores determinan el color rosado de éstos. Dentro de las células infectadas, la Lb se encuentra en el citosol, y no en el espacio peribacteroidal. La inducción de los genes que codifican para Lb en la planta ocurre durante el desarrollo del nódulo (Franssen et al., 1992). Una vez que el oxígeno difunde hasta la zona central de los nódulos, la Lb transporta el oxígeno desde la membrana plasmática de las células infectadas a la membrana del simbiosoma.

En condiciones fisiológicas, la mayor parte de la Lb del nódulo tiene el hierro de su grupo hemo en forma reducida (Lb^{2+}), y tiene la capacidad de oxigenarse (LbO_2). Dada la alta afinidad por la Lb por el oxígeno, con una K_m entre 48-60 nM, la concentración de oxígeno unido a la Lb en el citosol de las células infectadas es hasta 50000 veces mayor que la concentración de oxígeno libre, lo que hace que prácticamente todo el oxígeno que llega a los bacteroides es transportado por la Lb, mientras que una mínima parte llega como oxígeno libre. Gracias al fuerte gradiente de oxígeno que existe entre la membrana peribacteroidal y los bacteroides, el oxígeno libre difunde a través del espacio peribacteroidal por simple difusión y alcanza las oxidasas terminales de los bacteroides. Además, la leghemoglobina puede servir como almacén intracelular de oxígeno, de forma que los nódulos pueden acumular una elevada concentración global de oxígeno a bajas tensiones de oxígeno libre, y posibilita un elevado flujo del mismo hacia las oxidasas terminales de los bacteroides (Minchin, 1997).

C.2.3. Oxidasas terminales

Los bacteroides sintetizan oxidasas terminales con gran afinidad por el oxígeno, lo que determina que la concentración de oxígeno regule el flujo de electrones de la cadena respiratoria. Una vez que el oxígeno, transportado por la Lb, llega a la membrana del simbiosoma, difunde a través del espacio peribacteroidal hasta las oxidasas terminales de los bacteroides, al igual que el oxígeno libre. Se considera que la función de estas oxidasas es permitir tanto la síntesis de ATP a bajas concentraciones de oxígeno (respiración “eficiente”) como la eliminación de oxígeno desacoplada a la síntesis de ATP para altas concentraciones de oxígeno (respiración

“ineficiente”) (Appleby, 1984). Recientemente Talbi et al. (2012) observaron que la sobreexpresión de la oxidasa terminal cbb_3 en una cepa mutante de *R. etli* confería mayor tolerancia a sequía en plantas inoculadas con esta cepa y aliviaba los efectos negativos de la sequía en la fijación de nitrógeno, lo que indica la gran importancia de estas oxidasas bacterianas para mantener una tasa de fijación eficiente.

C.3. Metabolismo del carbono

Como hemos visto, la actividad nitrogenasa de los bacteroides requiere gran cantidad de energía en forma de ATP y poder reductor para romper el triple enlace del nitrógeno atmosférico y reducirlo hasta amonio (NH_3). Para producir esta energía y mantener una óptima tasa de fijación, la planta hospedadora suministra de forma continua fuentes de carbono al nódulo; por otro lado, estos compuestos aportados por la planta resultan esenciales para incorporar el nitrógeno fijado por el bacteroide a esqueletos carbonados. En la figura 6 se esquematizan los principales procesos del metabolismo del carbono y nitrógeno en una célula vegetal del nódulo y en el bacteroide.

C.3.1. Catabolismo de sacarosa y producción de malato

La sacarosa, disacárido formado por glucosa y fructosa, es producida mediante la fotosíntesis y constituye la principal fuente de carbono suministrada por la planta a los nódulos (Gordon et al., 1985; Streeter, 1987). La sacarosa es transportada de la parte aérea al nódulo a través del floema, y una vez en el nódulo debe ser metabolizada, ya que los bacteroides no son capaces de utilizarla directamente. Se conocen dos principales enzimas para la hidrólisis de la sacarosa en el nódulo, localizadas ambas en el citosol de las células vegetales: la invertasa alcalina (IA), que produce glucosa y fructosa, y la sacarosa sintasa (SS), que produce fructosa y UDP-glucosa gracias al aporte de UDP (Day and Copeland, 1991). La reacción catalizada por la sacarosa sintasa es reversible, pero *in vivo* funciona principalmente en el sentido de hidrólisis de la sacarosa y se localiza principalmente en tejidos sumideros como los nódulos (Chourey et al., 1998). La invertasa ácida presente en otros tejidos tiene en los nódulos niveles muy bajos o nulos de expresión.

La hidrólisis de sacarosa llevada a cabo por la IA no conserva la energía del enlace glucosídico entre glucosa y fructosa. En cambio, la actividad sacarosa sintasa da lugar a la formación de hexosas derivadas de UDP con un alto contenido energético. Otra diferencia entre los dos enzimas es su nivel de actividad según el estadio de desarrollo del nódulo: en nódulos maduros, la SS ha sido descrita en varios estudios como la principal actividad sacarolítica (Craig et al., 1999; Gordon et al., 1999), mientras que la IA es la principal encargada de metabolizar la sacarosa en los primeros estadios del desarrollo nodular, antes de que se inicie la FBN (Flemetakis et al., 2006). Asimismo, la IA parece jugar un papel clave en la producción de hexosas para la síntesis de almidón en el nódulo y en la provisión de carbono a otros microsimbiontes beneficiosos presentes en las raíces de las leguminosas (Schubert et al., 2003; Flemetakis et al., 2006; Horst et al., 2007).

La actividad sacarosa sintasa es esencial para sustentar la fijación de nitrógeno, como se ha demostrado en varios trabajos, entre ellos: 1) Gordon et al. (1999) observaron que los mutantes de guisante *rug4*, en los que la actividad SS se encontraba reducida un 90% respecto del parental, eran inefectivos en la fijación de nitrógeno, a pesar del incremento en la actividad IA observado; 2) Anton y Emerich (1990) observaron que la actividad sacarosa sintasa aumentaba coincidiendo con el establecimiento de la fijación de nitrógeno y la aparición de la leghemoglobina; 3) estudios de hibridación *in situ* e inmunolocalización de la enzima, que demostraron que el ARNm de la misma, así como la proteína, se encuentran en células efectivas y no efectivas de la zona simbiótica de nódulos determinados e indeterminados (Gordon et al., 1995; Van Geule et al., 1996). Estas observaciones sugieren que la expresión de este enzima en nódulos está estrechamente acoplada a la actividad nitrogenasa, especialmente en situaciones de estrés abiótico (Arrese-Igor et al., 1999).

Los productos de la hidrólisis de la sacarosa, fructosa y UDP-glucosa, pueden ser usados para la síntesis de almidón y almidón, o bien ser metabolizados por enzimas glucolíticos hasta producir ácidos dicarboxílicos, los cuales sirven de fuente de energía para los bacteroides (Day and Copeland, 1991). En la vía glucolítica la fructosa es convertida a fructosa-6-fosfato (F6P) por la acción de la fructouquinasa y el UDPG a glucosa-1-fosfato (G1P) por acción de la UDP-glucosa pirofosforilasa (UDPGPP).

Estas hexosas son interconvertibles entre sí y son hidrolizadas a través de la ruta glucolítica hasta la obtención de fosfoenolpiruvato (PEP). La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), enzima citosólica que constituye el 1-2% del total de proteína celular en el nódulo, cataliza la incorporación de hasta un CO_2 respiratorio (que se encuentra en disolución como HCO_3^-) al PEP para producir oxalacetato (OAA). La actividad de la PEPC es mayor en nódulos que en raíces, indicando que juega un papel esencial en la provisión de esqueletos carbonados para la asimilación del nitrógeno, así como para servir de fuente de energía a los bacteroides (Vance and Gantt, 1992). El enzima PEPC podría actuar como un mecanismo regulador del suministro de carbono al bacteroide, ya que su actividad está regulada tanto por los niveles de sacarosa procedentes del floema como de compuestos nitrogenados presentes en el xilema (Nakagawa et al., 2003). Además, al reciclar el CO_2 procedente de la respiración, la PEPC contribuye a la economía de los nódulos, reasimilando hasta un 32% del carbono respirado (Rainbird et al., 1984). Al ser extremadamente inestable, el OAA es rápidamente reducido a malato mediante el enzima malato deshidrogenasa (MDH), regenerando NAD^+ (Vance and Gantt, 1992). La actividad MDH aumenta rápidamente a medida que se desarrollan los bacteroides, así como la concentración de malato en nódulos (Ratajczak et al., 1989).

El malato es el ácido orgánico más abundante en nódulos y está implicado en múltiples funciones: es una de las principales fuentes de carbono y energía para la respiración bacteroidal (Lodwig and Poole, 2003), suministra esqueletos carbonados para la asimilación del nitrógeno fijado y la biosíntesis de compuestos nitrogenados (Rosendhal et al., 1990) y puede estar además implicado en la regulación de la difusión de oxígeno a través de un mecanismo osmoeléctrico (Gálvez et al., 2000). El papel clave que el malato tiene en nódulos de leguminosas se confirma por el hecho de que los nódulos inefectivos tienen menor contenido de malato (50%) en comparación con los nódulos efectivos (Vance and Heichel, 1991).

C.3.2. Metabolismo de carbono en el bacteroide: sistema Dct y ciclo TCA

Numerosas evidencias muestran que los ácidos dicarboxílicos constituyen la principal fuente de carbono para los bacteroides. En estudios llevados a cabo con $^{14}\text{CO}_2$

en nódulos intactos, se observó que cuando los nódulos fueron expuestos a $^{14}\text{CO}_2$, los ácidos dicarboxílicos malato, succinato y fumarato se marcaron rápidamente en el citosol de las células vegetales y el carbono marcado se incorporó rápidamente a los bacteroides principalmente en forma de malato (Rosendhal et al., 1990; Salminen and Streeter, 1992). Otros estudios in vitro han confirmado que los dicarboxilatos estimulan la fijación de nitrógeno en bacteroides, y además se han detectado concentraciones elevadas de dicarboxilatos en bacteroides de soja, guisante y alfalfa (Rosendhal et al., 1990; Lodwig and Poole, 2003). Asimismo, simbiosis en las que el rizobio está afectado por una mutación en el sistema de transporte de dicarboxilatos lleva a la pérdida de la capacidad para fijar nitrógeno (Whitehead and Day, 1997), mientras que mutantes de rizobio que tienen alterado el metabolismo o transporte de carbohidratos mantienen la capacidad de llevar a cabo la reducción simbiótica de nitrógeno (Udvardi and Day, 1997). Varios estudios indican que durante la formación del simbiosoma y diferenciación de los bacteriodes, éstos son capaces de utilizar otras fuentes de carbono, incluyendo tanto monosacáridos como polisacáridos y compuestos de reserva como PHB. Sin embargo cuando están totalmente diferenciados pierden esa capacidad y dependen exclusivamente de los ácidos dicarboxílicos para mantener la fijación de nitrógeno (Lodwig and Poole, 2003)

Sistema Dct: Dada la importancia de los ácidos dicarboxílicos como principal fuente de carbono para los bacteroides, se han realizado numerosos estudios acerca de su transporte desde el citosol a través de la membrana peribacteroidal, y de la propia membrana del bacteroide. Se ha confirmado la presencia de un transportador de ácidos dicarboxílicos en la membrana peribacteroidal de nódulos de varias leguminosas, con alta afinidad por malato y succinato (Udvardi et al., 1991), si bien se desconoce la naturaleza exacta de este transportador. Por el contrario, el transportador de dicarboxilatos de la membrana interna bacteroidal, denominado sistema Dct, se encuentra bien caracterizado a nivel bioquímico, genético y fisiológico. El sistema Dct presenta una alta afinidad por los sustratos malato, succinato y fumarato ($K_m < 10 \mu\text{M}$) (Glenn et al., 1980; Finan et al., 1983), y se ha demostrado que la mutación de este sistema de transporte en varias especies de rizobios da como resultado nódulos inefectivos para la fijación de nitrógeno por la incapacidad de los bacteroides para

utilizar malato, fumarato y succinato (Finan et al., 1983; Humbeck and Werner, 1989). El sistema está compuesto por tres componentes: DctA, DctB y DctD. DctA es una proteína de membrana que transporta dicarboxilatos, y DctB y DctD forman un sistema regulador-sensor que detecta la presencia de dicarboxilatos y regula la expresión del gen que codifica para DctA (Terpolilli et al., 2012).

Ciclo TCA: Tras entrar en el bacteroide, los ácidos dicarboxílicos son metabolizados mediante los enzimas del ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). El ciclo TCA, presente en todos los organismos con respiración aeróbica, es el punto central del metabolismo carbonado de los bacteroides, ya que proporciona equivalentes reductores, energía en forma de ATP y metabolitos para la producción de aminoácidos y otras rutas metabólicas. En general, todos los enzimas del ciclo TCA son indispensables para la fijación de nitrógeno, como se ha demostrado con el uso de rizobios mutantes en estos enzimas (Terpolilli et al., 2012). Sin embargo, dado el ambiente microaeróbico en el interior del nódulo, se ha sugerido que la actividad del ciclo TCA está reprimida en bacteroides. Los bacteroides han perdido la capacidad para reproducirse, y por tanto, no pueden usar el exceso de energía procedente del ciclo TCA para replicarse y necesitan un balance muy ajustado de entrada y salida de esqueletos carbonados del ciclo para evitar su inhibición por retroalimentación. De hecho, al incubar bacteroides aislados de *R leguminosarum* con bajas concentraciones de malato o succinato, se obtenían tasas muy eficientes de fijación de nitrógeno, mientras que al aumentar la concentración de dichos compuestos se producía una inhibición de la fijación. Este hecho sugiere que la demanda de carbono por el bacteroide es baja, y que una excesiva oxidación de los dicarboxilatos vía ciclo TCA ocasiona un desequilibrio en el metabolismo de los bacteroides (Prell and Poole, 2006). Se ha sugerido la existencia de otras rutas metabólicas en el bacteroide encargadas de reciclar el exceso de esqueletos carbonados, ATP y poder reductor para evitar la inhibición de la nitrogenasa por este desequilibrio (Lodwig and Poole, 2003).

C.4. Metabolismo del nitrógeno

C.4.1. Suministro de nitrógeno a la fracción vegetal

El amoníaco (NH_3) generado en los bacteroides por la actividad nitrogenasa difunde a través de la membrana bacteroidal hasta el espacio peribacteroidal, ayudado por el gradiente de concentración y por la diferencia de pH entre interior del bacteroide y el espacio peribacteroidal (Patriarca et al., 2002). El pH ácido del espacio peribacteroidal, favorece la transformación de NH_3 en NH_4^+ , el cual difunde a través de la MPB al citosol de la célula vegetal. En bacterias de vida libre se ha descrito un sistema de transporte de amonio, denominado Amt, pero en todos los casos estudiados se ha demostrado que no es funcional en el bacteroide (Patriarca et al., 2002). Además, en bacteroides están reprimidos los enzimas de asimilación de amonio (Vance et al., 1994). El pH ácido del espacio peribacteroidal se mantiene por un bombeo de H^+ realizado por ATP-*asas* de protones situadas en la MPB, que crean tanto un potencial de membrana como un gradiente de pH, y a la actividad de la cadena respiratoria de transporte de electrones del bacteroide, que bombea protones H^+ al espacio peribacteroidal. La salida de NH_4^+ desde el espacio peribacteroidal hasta el citosol vegetal tendría lugar a través de un canal iónico situado en la membrana peribacteroidal. El NH_4^+ no puede reingresar al bacteroide porque los transportadores de NH_4^+ de la MPB se encuentran reprimidos en el estado simbiótico, lo cual facilita el flujo de éste hacia la planta (Howitt and Udvardi, 2000). Este flujo ayudaría a mantener la simbiosis, ya que se demostró que la expresión forzada de un transportador Amt en bacteroides provocaba una inhibición de la fijación de nitrógeno (Taté et al., 1998). También se han identificado transportadores de cationes monovalentes en la MPB, que permiten un alto flujo de amonio hacia el citosol de la célula vegetal (Rosendahl et al., 2001).

El modelo comúnmente aceptado postula que los bacteroides exportan el nitrógeno fijado en forma de amonio a la célula vegetal, sin embargo estudios realizados con bacteroides aislados en los últimos años demuestran que otros productos nitrogenados como la alanina son excretados desde los bacteroides, y que este mecanismo podría ser otra forma de transporte del nitrógeno fijado al citosol de la

célula vegetal (Waters et al., 1998; Rosendahl et al., 1992). Este mecanismo, conocido como “ciclo de intercambio alanina-piruvato”, implica que el NH_4^+ formado como consecuencia de la fijación de nitrógeno es asimilado en el bacteroide por acción de la alanina deshidrogenasa, que produce alanina a partir del NH_4^+ y piruvato. El modelo propuesto indica que cuantitativamente esta forma de exportación superaría a la excreción de amonio. Recientemente se ha cuestionado este modelo, ya que estos experimentos fueron llevados a cabo en condiciones de baja tensión de oxígeno y con altas densidades de bacteroides; bajo estas condiciones, se produce una acumulación de NADH y piruvato, y se propicia la formación de alanina, por lo que en condiciones naturales las concentraciones de alanina serían bastante menores (Day et al., 2001a). Allaway et al. (2000), usando un mutante de *R. leguminosarum* que carecía de la actividad alanina deshidrogenasa, demostraron que este enzima no es esencial para la fijación de nitrógeno, ya que con este mutante se obtenían nódulos funcionales en plantas de guisante. En este mismo estudio, se confirmó que el amonio es el principal producto exportado desde los bacteroides, aunque la alanina también es transportada al citosol vegetal, en menor medida. Además, las plantas inoculadas con el mutante eran un 20% más pequeñas que los controles, y por tanto el flujo de alanina complementaría al del NH_4^+ para asegurar una óptima tasa de fijación, si bien no se ha podido demostrar que la alanina procedente del bacteroide sea transportada al resto de la planta (Allaway et al., 2000; Day et al., 2001b). Además de alanina, se ha propuesto el aspartato producido en el bacteroide como forma de transporte del nitrógeno fijado, mediante un transportador descrito en la membrana peribacteroidea (Rosendahl et al., 1992; Rudbeck et al., 1999). Por otra parte también se ha demostrado la existencia de un complejo sistema de intercambio de aminoácidos entre el bacteroide y la célula vegetal a través de un transportador de tipo ABC (ATP Binding Cassette) de amplia especificidad para el transporte de aminoácidos, denominado Aap/Bra, situado en la membrana del bacteroide y esencial para el proceso de fijación biológica de nitrógeno (Lodwig et al., 2003). La función del transportador Aap/Bra y del reciclado de aminoácidos será explicada en detalle más adelante.

En este sentido, Larrainzar et al. (2007), en un estudio proteómico de la simbiosis *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti*, detectaron diversos enzimas encargados de la asimilación del amonio en bacteroides, aunque en niveles muy bajos.

C.4.2. Asimilación del amonio

En general, se acepta que los bacteroides asimilan muy poca cantidad de amonio que fijan, el cual es exportado casi totalmente a la planta hospedadora (Vance et al., 1994). El amonio que llega al citosol vegetal procedente del bacteroide es asimilado por el ciclo GS/GOGAT (Cullimore and Benett, 1988). La glutamina sintetasa (GS) se localiza en el citosol, aunque en algunas leguminosas también existe una isoforma plastidial, y cataliza la asimilación dependiente de ATP del NH_4^+ en glutamina, utilizando glutamato como sustrato (Cullimore and Bennett, 1988). El enzima glutamato sintasa dependiente de NADH (GOGAT) está presente en tejidos vegetales no fotosintéticos, como raíces y nódulo, y dentro de éste se localiza en el plastidio (Trepp et al., 1999) y cataliza la transferencia de un grupo amino desde la glutamina hasta la posición α -ceto del 2-oxoglutarato (2OG), dando lugar a dos moléculas de glutámico. Otro enzima importante en el proceso de asimilación del NH_4^+ es la aspartato aminotransferasa (AAT) que cataliza la transaminación del glutamato para dar aspartato, que es utilizado por la asparagina sintetasa (AS) como sustrato para la síntesis de asparagina.

En nódulos de leguminosas, se ha observado actividad isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP^+ (ICDH) tanto en la fracción soluble vegetal como en los bacteroides. En las células vegetales existen diversas isoenzimas de ICDH localizadas en distintos compartimentos, como plastidios, mitocondrias y peroxisomas. Sin embargo, la isoforma citosólica representa entre un 90-95% de la actividad total (Chen, 1998) y se ha propuesto como importante candidato para el aporte de 2OG para la incorporación del amonio a través del ciclo GS/GOGAT, puesto que la ICDH es el único enzima productor de éste en el citosol (Henson et al., 1982), donde tiene lugar principalmente la asimilación de amonio (Duke and Henson, 1985). Este enzima cataliza la descarboxilación oxidativa de isocitrato a 2OG acoplada a la reducción de un nucleótido de piridina y supone un punto clave de unión entre los flujos metabólicos

del carbono y el nitrógeno. La ICDH, junto con las dos deshidrogenasas de la ruta de las pentosas fosfato y el enzima málico, constituye la principal fuente de NADPH celular, por lo tanto, otra función de la ICDH es contribuir al ciclo antioxidante ascorbato/glutación, que depende de los niveles de NADPH citosólicos (Hodges et al., 2003; Marino et al., 2007). Además, la isoforma citosólica podría desempeñar un papel importante integrando los metabolismos mitocondrial (producción y liberación de citrato) y plastidial (toma de 2OG y asimilación de nitrógeno).

C.4.3. Exportación del nitrógeno fijado a la planta

Las leguminosas pueden ser clasificadas como exportadoras de ureidos o de amidas dependiendo de los compuestos nitrogenados utilizados para el transporte del nitrógeno fijado desde el nódulo al resto de la planta. En general, las leguminosas de clima templado, como guisante, alfalfa (*Medicago sativa*), *M. truncatula* o trébol (*Trifolium* spp.) exportan amidas, sobre todo en forma de asparagina y glutamina, y la mayoría se caracterizan por poseer nódulos indeterminados (Vance, 2000). Las leguminosas de origen tropical o subtropical, como la soja, la alubia o la judía son exportadoras de ureidos, sobre todo en forma de alantoina, ácido alantoico y, en menor medida, citrulina, y en su mayor parte forman nódulos determinados; no obstante, el transporte de ureidos en estas plantas sólo se produce cuando fijan nitrógeno activamente, mientras que en condiciones no simbióticas o en los estadios iniciales de la simbiosis exportan amidas. La biosíntesis de ureidos es bastante compleja, ya que se desarrolla en parte en las células no infectadas e intersticiales que rodean a la célula infectada, y es precedida de la síntesis de purinas. Las purinas se sintetizan en los plastidios de las células infectadas a partir de glutamina, glicina, aspartato y ribosa-5-fosfato, derivada de los nucleótidos. Posteriormente, las purinas se oxidan para formar ácido úrico (Schubert, 1986), el cual es transportado a las células no infectadas adyacentes, donde es transformado en alantoina y ácido alantoico. Éstos a su vez son transportados a través del xilema al resto de la planta. La proporción de alantoina/ácido alantoico varía según las especies. El transporte de nitrógeno en forma de ureidos, menos solubles que las amidas, tiene como ventaja que en ellos la relación C:N es mayor: mientras que en la alantoina y ácido alantoico la relación es de 4:4, en la

glutamina y asparagina es de 5:2 y 4:2, respectivamente. Por lo tanto, se puede considerar que los ureidos son una forma más eficiente para transportar el nitrógeno fijado, ya que para la misma cantidad de nitrógeno, se necesitan menos esqueletos carbonados. Por esta razón, se estima que el coste metabólico en ATP de la síntesis de ureidos es hasta un 50% menos de lo que se necesita para sintetizar asparagina. Además, se sabe que las leguminosas transportadoras de ureidos toleran mejor la presencia de nitrato o amonio en el medio radical (Argillier et al., 1989).

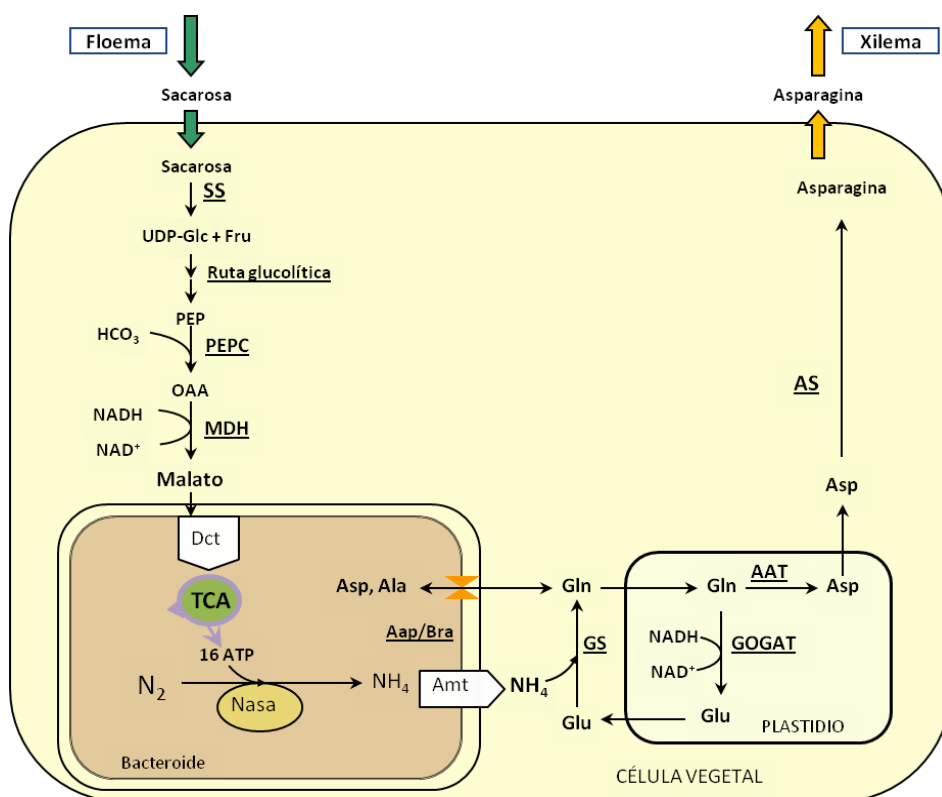


Figura 6: representación esquemática de las principales rutas metabólicas en nódulos de leguminosas exportadoras de amidas. UDP-Glc: UDP-glucosa; Fru: fructosa; Dct: sistema de transporte de dicarboxilatos; TCA: ciclo de los ácidos tricarboxílicos; Nasa: nitrogenasa

C.4.4. Reciclado de aminoácidos: sistema Aap/Bra

El sistema de reciclado de aminoácidos entre el bacteroide y la planta descrito en el apartado C.4.1 se debe a la presencia en la membrana bacteroidal de dos transportadores de tipo ABC (ATP Binding Cassette, casete de unión a ATP), descritos en *Rhizobium leguminosarum*: AapJQMP y BraDEFGC (Walshaw and Poole, 1996; Hosie et al. 2002). AapQM y BraDE son los dominios transmembrana, AapP y BraFG se ocupan de la unión e hidrólisis de ATP y AapJ y BraC son los dominios intracelulares de unión a aminoácidos y otros compuestos. Ambos transportadores presentan una amplia especificidad para el transporte activo de aminoácidos a través de la membrana bacteroidal acoplado a la hidrólisis de ATP, y han sido caracterizados tanto genéticamente como funcionalmente, mediante ensayos de transporte con diversos aminoácidos marcados con radioactividad (White, 2006). AapJQMP ha sido caracterizado como una permeasa general para L-aminoácidos capaz de transportar aminoácidos básicos, alifáticos (leucina y alanina) y polares (ácido glutámico, ácido aspártico, e histidina, sobre todo), al interior y exterior de la membrana bacteroidal (Poole et al., 1985; Walshaw and Poole, 1996). Asimismo, BraCDEFG es capaz de transportar, también de forma bi-direccional, aminoácidos ácidos, básicos y polares, con una alta especificidad para alanina, leucina, histidina, y GABA, siendo el único transportador ABC capaz de transportar este aminoácido no proteico (Hosie et al., 2002). La importancia de estos transportadores en la provisión de aminoácidos al bacteroide se demostró en este último trabajo (Hosie et al., 2002), ya que los mutantes en uno de los transportadores (Aap o Bra) presentaron un crecimiento limitado con diversos aminoácidos como única fuente de carbono y nitrógeno, y el crecimiento del doble mutante *aapJQM/braE* (RU1357) resultó inhibido por completo. Además, al inocular el doble mutante en plantas de guisante, se observó una reducción importante tanto en el crecimiento como en la tasa de fijación, con respecto a las plantas inoculadas con la cepa parental (Lodwig et al., 2003). Sin embargo, la biomasa y fijación de nitrógeno de las plantas inoculadas con mutantes en uno de los transportadores, fueron similares a los de la cepa parental. Además, los bacteroides aislados del doble mutante *aap/bra* eran capaces de reducir nitrógeno, demostrando que el bloqueo en el transporte de aminoácidos a la planta causado por las mutaciones

era lo que limitaba la fijación en estas plantas. Estas observaciones llevaron a los autores a proponer un modelo de intercambio de nutrientes entre la planta y el bacteroide, según el cual existe un complejo sistema de reciclado de aminoácidos entre los dos simbios, esencial para una simbiosis efectiva. Según este modelo, el bacteroide no sólo exporta amonio a la planta como forma del nitrógeno fijado (de acuerdo con el modelo clásico de intercambio de nutrientes en el nódulo), sino también aminoácidos como ácido aspártico o glutámico, y por tanto el suministro de estos aminoácidos a la planta es necesario para mantener una tasa óptima de fijación. Por otro lado, se ha demostrado que la provisión de aminoácidos ramificados de la planta hacia los bacteroides a través de estos transportadores es esencial para el desarrollo de los mismos (Prell et al., 2009).

Este modelo conlleva importantes consecuencias para la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Explicaría la ausencia de capacidad de incorporación de amonio por parte del bacteroide, puesto que la planta suministra al bacteroide una forma nitrogenada sintetizada a partir del amonio. Podría parecer que el macrosimbionte está ejerciendo un papel dominante en la simbiosis al aportar aminoácidos al bacteroide, sin embargo los bacteroides actuarían como orgánulos vegetales para la síntesis de aspártico, lo que obliga a la planta a depender de ellos, favoreciéndose así la evolución de una relación mutualista, de forma que cada uno de los simbios habríá desarrollado una total dependencia metabólica del otro (Ladrera, 2007).

D. IMPORTANCIA AGRÍCOLA Y AMBIENTAL DE LAS LEGUMINOSAS Y LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO

D.1. Las leguminosas

La familia de las leguminosas está constituida por unos 700 géneros y unas 19000 especies de árboles, arbustos y plantas herbáceas, distribuidas en tres subfamilias: Cesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae. De ellas, aproximadamente el 20% tienen la capacidad para nodular y fijar nitrógeno (Sprent, 2001). Las leguminosas constituyen una de las familias de plantas terrestres con mayor éxito de distribución, en parte debido a la FBN, que les permite colonizar suelos con baja disponibilidad de nitrógeno, o que incluso carecen de él. Esta característica, junto con el elevado contenido en proteínas que presentan las leguminosas, las sitúa en el origen de la agricultura. Hoy en día, las leguminosas siguen siendo una parte esencial de la agricultura tanto tradicional como moderna. Entre las especies que más se utilizan para el consumo humano se pueden citar, entre otras, el guisante (*Pisum sativum*), el garbanzo (*Cicer arietinum*), diversas especies de judías (*Phaseolus vulgaris*, *P. lunatus*, *P. coccineus*), la alubia (*Vicia faba*), la lenteja (*Lens culinaris*), la soja (*Glycine max*), y el cacahuete (*Arachis hipogaea*).

Dependiendo del uso y destino de la producción de las leguminosas cultivadas por el hombre, se pueden dividir en dos grupos: leguminosas forrajeras, de las cuales se aprovechan sus hojas y tallos para alimentación animal mediante pastoreo o corte, y leguminosas de grano, cuyo principal interés económico está en sus semillas, que pueden ser destinadas tanto a alimentación animal como humana. Las leguminosas de grano y forrajeras ocupan aproximadamente el 15% de la superficie terrestre cultivada (Graham and Vance, 2003), y suponen el 27% de la producción mundial de cultivos y alrededor del 33% de la proteína necesaria para cubrir las necesidades nutricionales humanas (Vance et al., 2000).

El uso de las leguminosas y la alternancia de cultivo entre las leguminosas y los cereales han constituido parte esencial de muchos sistemas agrícolas de todo el mundo desde sus inicios. Así, en regiones mediterráneas, el cultivo de la cebada y el trigo han ido tradicionalmente seguidos o acompañados de habas, guisantes, garbanzos, etc,

mientras que la alternancia entre el maíz y el frijol constituye la rotación de cultivos predominante en regiones tropicales de América Central y del Sur. Una de las razones para el uso extensivo de estos sistemas de rotación es que estos cultivos presentan diferentes requerimientos nutricionales, lo que les convierte en cultivos complementarios en la extracción de nutrientes del suelo. Pero, sin duda, el mayor beneficio derivado de esta rotación de cultivos es el papel que juegan las leguminosas como fertilizante nitrogenado natural para el suelo, debido al proceso de FBN y a su alto contenido en nitrógeno; así, el nitrógeno derivado de la FBN contribuye de manera importante a la disponibilidad de N del cultivo siguiente (Peoples et al., 2001). Además, la alternancia de cultivos ayuda a reducir las plagas y enfermedades, ya que supone una ruptura en la continuidad de los mismos. El cultivo alternado de leguminosas y cereales entre líneas, denominado “intercropping”, es otra alternativa de cultivo beneficiosa para el medio ambiente, ya que, al igual que la rotación, aumenta la diversidad del cultivo reduciendo el riesgo de plagas y enfermedades a la vez que reduce las necesidades de fertilizantes nitrogenados sintéticos (Jensen and Hauggaard-Nielsen, 2003).

Además de ser complementarios en los sistemas agrícolas, los cereales y las leguminosas son también complementarios desde el punto de vista nutricional, tanto en alimentación humana como animal. Los cereales aportan principalmente hidratos de carbono y son pobres en proteínas, mientras que las leguminosas son ricas en proteínas y aminoácidos esenciales. De hecho, la ingesta combinada de cereales y legumbres (semillas comestibles de las plantas leguminosas) proporciona todos los aminoácidos esenciales necesarios en la dieta y hace que la proteína de origen vegetal pueda tener un alto valor biológico para la nutrición humana, similar al de la proteína animal. Las legumbres son ricas en aminoácidos de los que carecen los cereales, como lisina, mientras que los cereales presentan un alto contenido en metionina y las legumbres son deficitarias en este aminoácido esencial. De este modo, la combinación entre cereales y leguminosas se puede considerar como un sustituto de la proteína animal, con el mismo e incluso mayor valor nutritivo.

D.2. Valor ecológico y agronómico de la FBN

El reparto de los recursos nitrogenados entre plantas fijadoras y no fijadoras contribuye al mejor uso del N, dado que en la mayoría de explotaciones agrícolas el N edáfico es un recurso limitante (Hauggaard-Nielsen et al., 2001). Según Peoples et al. (1995), distintas vías hacen que el nitrógeno fijado simbióticamente esté disponible para un cultivo acompañante o sucesivo:

- 1) liberación por exudados de la raíz
- 2) transferencia entre especies mediada por micorrizas
- 3) descomposición de las hojas que caen al suelo
- 4) descomposición de raíces y nódulos
- 5) como abono verde

La cantidad y disponibilidad de nitrógeno fijado simbióticamente para cultivos acompañantes o sucesivos están determinadas por factores genéticos y ambientales, así como por las prácticas agrícolas. Por ello, a pesar de que los cereales son la base de la alimentación humana y de la agricultura, su cultivo requiere del uso de leguminosas para asegurar una fuente de nitrógeno natural y para contribuir al desarrollo de una agricultura sostenible (Hardason and Atkins, 2003).

Aparte de contribuir al aumento de fertilidad del suelo, la FBN conlleva otras ventajas agronómicas, como son la mejora en la estructura y estabilidad de los agregados del suelo, ya que favorece el crecimiento en profundidad de las raíces, la protección contra la erosión y el aumento de la biodiversidad, al promover en el suelo el crecimiento de una población microbiana asociada a la rizosfera (Hardason et al., 2003). Asimismo, al morir la planta, el nitrógeno fijado biológicamente se une a la materia orgánica del suelo, lo que evita las transformaciones químicas y factores físicos que dan lugar a pérdidas de nitrógeno en el suelo por volatilización y lixiviación.

D.3. Fijación biológica de nitrógeno vs fertilización nitrogenada

La introducción en el primer cuarto de siglo del proceso Haber-Bosch para la obtención de amonio supuso la disponibilidad de fertilizante nitrogenado sintético,

alternativo a los abonos naturales (los más usados han sido y son estiércol y guano procedente de animales) y a un precio relativamente bajo. Su uso masivo se manifestó, de forma evidente, en los cultivos básicos, en la llamada revolución verde de la agricultura, desarrollada entre los años 1940 y 1970. La primera Revolución Verde se debió a la aplicación masiva de fertilizantes sintéticos, a la utilización de nuevas variedades de plantas de alto rendimiento y al uso de grandes cantidades de pesticidas, así como al uso de maquinaria pesada agrícola, imponiéndose con frecuencia el monocultivo frente a la diversificación de cultivos, por ser más rentable económicamente. No obstante, la utilización de fertilizantes sintéticos presenta una serie de desventajas. Por un lado, supone un gran consumo de combustibles fósiles para obtener las altas temperaturas y presiones requeridas en el proceso de producción de fertilizantes, así como para el transporte de los fertilizantes, lo cual contribuye al aumento las emisiones de CO₂ a la atmósfera, causantes del efecto invernadero y del calentamiento global.

Las entradas anuales totales de nitrógeno procedentes de la FBN se sitúan alrededor de los 100 millones de t de nitrógeno (Cleveland et al., 1999), de las cuales 40-60 millones de t de nitrógeno se deben a la FBN de los cultivos en campo (Graham and Vance, 2003). Por su parte, 83 millones de t de N son fijadas anualmente por la industria mediante el proceso de Haber-Bosch para su posterior utilización como fertilizante nitrogenado (Jenkinson, 2001). Se ha calculado que para sustituir el nitrógeno fijado por las leguminosas por el producido mediante el proceso Haber-Bosch se necesitarían 288 millones de t de combustible, con un coste aproximado de 30000 dólares por año (Vance, 1998). El rendimiento de los cultivos que se establecen en un terreno aumenta si en ese terreno se habían cultivado leguminosas anteriormente, y ese incremento en producción es equivalente al que se obtiene tras la aplicación de 30-80 Kg de fertilizante nitrogenado por hectárea. (Tate, 1995).

La utilización de fertilizantes nitrogenados contamina suelos, ríos y cursos subterráneos de agua (acuíferos) por la lixiviación de nitratos y por la emisión de óxidos de nitrógeno a la atmósfera. Se calcula que sólo el 50% del nitrógeno inorgánico suministrado al suelo como fertilizante es incorporado por las plantas, y que sólo un 17% del total del N aplicado a las plantas es asimilado por el hombre en la

dieta (Zigler et al., 1992; Olivares et al., 2013). La acumulación de nitratos en el agua destinada al consumo humano también es perjudicial para la salud, ya que puede provocar metahemoglobinemia adquirida, enfermedad provocada porque los nitritos derivados del nitrato y de conservantes alimentarios oxidan el hierro de la hemoglobina, la cual se convierte en metahemoglobina, que tiene mayor afinidad por el oxígeno transportado en la sangre y por tanto no se libera en los tejidos, causando hipoxia en los tejidos y en ocasiones la muerte (Sánchez-Echániz et al., 2001). La acidez normal del estómago en adultos suele minimizar la reducción de nitrato a nitrito, pero los lactantes y niños pequeños presentan menor acidez estomacal, siendo especialmente susceptibles a esta enfermedad (Atlas and Bartha, 2002). Además, los nitritos pueden reaccionar con los grupos amino en el organismo, originando nitrosaminas, compuestos altamente cancerígenos. Esta problemática ambiental y sanitaria dio lugar a la Directiva del Consejo Europeo 91/676/CEE, del 12 de diciembre de 1991, relativa a la protección de las aguas contra la contaminación producida por el excesivo uso del nitrato en la agricultura. En ella se establece un código de Buenas Prácticas Agrarias como guía orientadora y se obliga a determinar las zonas contaminadas por nitratos como “zonas vulnerables”. Además, en el año 2011, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición publicó en su página web una serie de recomendaciones de consumo de hortalizas de hoja verde por su alto contenido en nitratos http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/rincon_consumidor/subseccion/nitratos_hortalizas.shtml

El incremento en el uso de la fijación biológica del nitrógeno en la agricultura contribuiría, por tanto, a:

- a) Reducir hasta en un 50% la producción de fertilizantes para cubrir la demanda de los cultivos, con la consiguiente reducción en la emisión de CO₂
- b) Evitar la contaminación de las aguas por nitratos, ya que el nitrógeno fijado biológicamente por los rizobios es directamente asimilado en su totalidad por la planta.

- c) Disminuir el uso de fertilizantes en los cultivos, con el consiguiente ahorro económico en los costes de producción.

D.4. Fijación de nitrógeno y agricultura sostenible

En el contexto de la agricultura sostenible, las acciones encaminadas a disminuir el uso de fertilizantes nitrogenados cobran gran importancia. Este es el caso de la FBN, que si bien limitada a algunos cultivos, éstos son de alto interés social y económico. La agricultura sostenible supone la producción de alimentos reduciendo los costes de producción, con menor aplicación de fertilizantes y pesticidas, que preserve mejor los recursos y de lugar a menores residuos. En este tipo de agricultura, la FBN tiene un lugar importante al representar el aprovechamiento del nitrógeno libre en la atmósfera para incrementar la productividad y disminuir el riesgo de contaminación de las aguas superficiales y acuíferos. La FBN tiene para dos ventajas principales para el medio ambiente: por un lado, representa una alternativa sostenible a la fertilización nitrogenada, y además, la utilización de plantas fijadoras puede evitar la erosión del suelo y contribuye a su recuperación en suelos erosionados o contaminados por metales pesados (López-Bellido, 2006). Por otro lado, a diferencia de la gran cantidad de energía fósil empleada en la producción de fertilizantes nitrogenados, la energía que se emplea en la FBN es inagotable, ya que deriva de la fotosíntesis.

El empleo de especies fijadoras de nitrógeno como componente principal en la rotación de cultivos era la práctica habitual antes del desarrollo del proceso Haber-Bosch en los años 40 (Fujiata et al., 1992). A partir de entonces, el empleo de leguminosas en sistemas agrícolas de países desarrollados descendió debido al bajo coste de los fertilizantes nitrogenados, al aumento del rendimiento de las cosechas de cereales, y a otros intereses económicos y políticos (Bohlool et al., 1992). Por el contrario, más del 50% de los cultivos de países subdesarrollados y en desarrollo emplean la rotación de cultivos con especies fijadoras de nitrógeno, ya que el elevado gasto energético que se requiere para la producción de fertilizantes nitrogenados limita su uso.

En la actualidad, las leguminosas son poco utilizadas en las rotaciones de cultivos cuando hay disponibilidad de fertilizantes nitrogenados, y dependen más del

valor económico de su producción que de su contribución al medio ambiente o a través de la FBN. Además, hay diversos problemas asociados al cultivo de leguminosas: bajos rendimientos, bajo precio en el mercado, difícil comercialización e insuficiente integración de la producción en el sector industrial de piensos (López-Bellido, 2006). Los sistemas de cultivo con leguminosas son un negocio incierto para el agricultor, ya que tiene que elegir entre los beneficios que conlleva a largo plazo el cultivo de leguminosas, como la mejora de la fertilidad del suelo, y el beneficio económico a corto plazo que reportan los cultivos de cereales, más rentables. Por ello, las políticas agrarias deberían alentar la adopción de prácticas y sistemas sostenibles, apoyando el uso de leguminosas en los modernos sistemas de cultivo.

D.5. Factores que limitan el uso de la FBN en agricultura

El establecimiento de las simbiosis entre leguminosas y rizobios es un proceso complejo en el que intervienen varios pasos y señales químicas, por lo tanto, cualquier alteración en alguno de los estadios del desarrollo nodular puede disminuir la eficiencia de la asociación y de la tasa de fijación. En el proceso de FBN se produce un ajustado balance metabólico entre ambos simbioses, y por tanto la efectividad del proceso depende tanto del estado fisiológico de la planta como de la capacidad de la bacteria para competir en la rizosfera, formar nódulos y reducir nitrógeno de forma eficiente. Puede ocurrir que una cepa de rizobio competitiva no exprese su capacidad total para fijar nitrógeno si hay factores que limitan el crecimiento de la leguminosa hospedadora (Peoples et al., 1995b).

Entre los estreses que afectan a los cultivos se encuentran estreses bióticos como enfermedades, insectos y malas hierbas, y estreses abióticos, siendo estos últimos los que ocasionan mayores pérdidas en la productividad de los cultivos (Bray et al., 2000). Los estreses ambientales que pueden disminuir la eficiencia de la fijación en leguminosas noduladas incluyen la disminución de la fotosíntesis (por sombreado), la hipoxia por encharcamiento de la rizosfera, el estrés hídrico (sequía), la salinidad del agua de riego, la presencia de nitratos en el suelo, temperaturas extremas, metales pesados, pesticidas y déficit de nutrientes minerales (Walsh, 1995; O'Hara, 2001).

Además, algunos estreses ocurren simultáneamente: a menudo las altas temperaturas están asociadas a condiciones de déficit hídrico.

Las altas temperaturas alcanzadas en los suelos de zonas tropicales (hasta 50° C) afectan a la nodulación y al crecimiento vegetal, y por tanto a la FBN (Hungria and Vargas, 2000). Además, en zonas de clima mediterráneo se pueden alcanzar temperaturas de más de 40 °C durante el verano, acompañadas de situaciones de sequía, y en ocasiones también de salinización del agua de riego, que produce estrés osmótico en la planta. Esta combinación de factores acelera la senescencia de la planta e inhiben rápidamente la FBN (O'Hara et al., 2002).

Tanto la fisiología de las leguminosas como el crecimiento de los rizobios en la rizosfera se ven afectados por un suelo demasiado ácido o demasiado alcalino, con un pH fuera del rango considerado normal, entre 5 y 8 (Sadowski and Graham, 1998). En ambos simbioses, la absorción de elementos minerales de elementos minerales del suelo, necesarios para su crecimiento, depende del pH del suelo, y algunos minerales sólo pueden ser absorbidos en un estrecho rango. Además, se ha demostrado que el pH del suelo influye en la efectividad del establecimiento de la simbiosis y al proceso de fijación de nitrógeno en sí. La acidificación de los suelos afecta a más de 1500 millones de ha en la superficie terrestre, y sus efectos negativos en la productividad agrícola han aumentado y se acentuarán aún más a causa de la lluvia ácida, la fertilización nitrogenada, el cambio climático y la toxicidad por metales como el Al y el Mn. (Graham and Vance, 2000).

Otro factor a tener en cuenta para una simbiosis efectiva es una concentración óptima de nutrientes minerales. Las deficiencias minerales afectan tanto a los rizobios como a las leguminosas, así como al establecimiento de la simbiosis y al proceso de fijación en sí (Bolaños and Bonilla, 2010). La carencia o limitación en uno o varios nutrientes minerales afecta a diversas características fisiológicas de los rizobios de vida libre, como son su capacidad de crecimiento, la toma de nutrientes y la regulación génica. Los macroelementos considerados esenciales para el crecimiento de los rizobios y el establecimiento de la simbiosis son: fósforo (P), potasio (K), azufre (S) y calcio (Ca). Además, para la efectividad de las simbiosis fijadoras, es importante un aporte de los siguiente micronutrientes: hierro (Fe), boro (B), cobalto (Co), cobre (Cu),

zinc (Zn) y molibdeno (Mo), además del níquel (Ni) y el selenio (Se) como elementos traza (O'Hara, 2001). Los efectos de las deficiencias de P y Fe en la fijación de nitrógeno y la simbiosis son las más estudiadas, dado que son las que más limitan la productividad de leguminosas en simbiosis en determinados suelos agrícolas, junto con el Ca y el Mo (O'Hara et al., 2001; Bolaños and Bonilla, 2010). El P es necesario para el aporte de energía a la nitrogenasa, en forma de ATP, y el Fe y el Mo forman parte de los centros activos de la nitrogenasa (apartado C.1), mientras que el Ca tiene un papel esencial en la señalización celular de las fases iniciales de la formación de un nódulo, como se ha explicado en el apartado 2.3.3. No parece que la deficiencia de B afecte al crecimiento de los rizobios en vida libre, sin embargo en simbiosis se ha demostrado que la falta de B provoca una reducción en el número de nódulos y en la tasa de fijación, ya que afecta a la producción de exopolisacáridos celulares por los rizobios, implicados en la transducción de señales en las primeras fases de la simbiosis (Abreu et al., 2012). Por su parte, el Zn, Co, Cu, Ni y Se son tienen importantes funciones como en plantas y microorganismos. En plantas, participan en procesos como la producción de auxinas y citocromos y la fotosíntesis como cofactores de enzimas, pero se desconoce en qué procesos concretos de la simbiosis intervienen. En cuanto al S, su relación con la fijación de nitrógeno viene dada porque forma parte de los centros activos de la nitrogenasa, la ferredoxina y otros enzimas y moléculas importantes en las simbiosis fijadoras, como se tratará ampliamente en el apartado E de la presente Introducción.

El factor ambiental que más limita la producción agrícola y que mayores pérdidas causa es el estrés hídrico por sequía, y el aumento de las temperaturas en los últimos años a causa del cambio climático contribuye a agravar el problema (Kramer and Boyer, 1997; Olivares et al., 2013). En leguminosas fijadoras, incluso una sequía moderada o transitoria causa rápidos descensos en la fijación de nitrógeno, antes de que la fotosíntesis u otros procesos fisiológicos se vean afectados (Arrese-Igor et al., 2012). El efecto negativo de la sequía en la fijación ya se conoce desde los años 70 (Sprent, 1972); sin embargo, aún no se sabe con exactitud el mecanismo o mecanismos responsables del descenso de la FBN por estrés hídrico. Los estudios realizados hasta la fecha sugieren que esta inhibición se produce como resultado de tres principales

mecanismos fisiológicos: una limitación de oxígeno a los nódulos, la inhibición feedback por compuestos nitrogenados, y una limitación en el flujo de carbono al bacterioide (Arrese-Igor et al., 2012 y referencias incluidas). El daño oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno y nitrógeno producidas en condiciones de estrés, podría estar también implicado en el descenso de FBN en condiciones de sequía (Naya et al., 2007; Marino et al., 2008).

D.6. Estrategias para mejorar la fijación de nitrógeno

La población mundial, actualmente de más de 7000 millones de habitantes, presenta un crecimiento exponencial, y se estima que llegará hasta los 9000 millones en el año 2050, según el informe de la ONU: “World Population Prospects” http://esa.un.org/wpp/Documentation/pdf/WPP2012_HIGHLIGHTS.pdf). Este estudio indica que la mayoría de la población residirá en regiones tropicales y subtropicales de países en vías de desarrollo de Asia, África y América del Sur, que son también las regiones más pobres y con menos recursos del planeta. En estos países, los recursos agrícolas sólo suministran el 80% de las necesidades nutricionales, y la falta de agua y la desertización causadas por el cambio climático contribuyen a acrecentar los problemas de escasez de recursos agrícolas, cada vez más insuficientes para alimentar a una población en constante aumento. Dado que el nitrógeno limita en gran medida la productividad de los cultivos, la cantidad de nitrógeno necesario para la agricultura aumentará significativamente en las próximas décadas de forma paralela a la población mundial, lo cual puede llevar a contaminar aún más el medio ambiente si se usan principalmente fertilizantes nitrogenados. Teniendo en cuenta el potencial de la FBN para reducir la aplicación de fertilizantes químicos y su impacto en el medio ambiente, en los últimos años se están desarrollando diversas estrategias encaminadas a incrementar el aporte de nitrógeno procedente de la FBN a los suelos y para optimizar el uso de este proceso biológico en sistemas agrícolas. De estas estrategias, las más destacadas son la optimización de las simbiosis rizobio-leguminosa y el desarrollo de simbiosis fijadoras en cereales.

D.6.1. Optimización de las simbiosis rizobio-leguminosa

Con el fin de mejorar la eficiencia de la fijación de nitrógeno en leguminosas, se han desarrollado programas de mejora genética en diversas especies de leguminosas. Además, la mejora clásica mediante selección de variedades de leguminosas más eficientes para la FBN en suelos pobres en N puede lograr un incremento de hasta un 300% en la FBN (Layzell and Moloney, 1994).

Otro aspecto a considerar para optimizar la FBN en leguminosas es el uso de especies de rizobios tanto competitivas para la nodulación como efectivas para la fijación. En este sentido, un problema común es la presencia en el suelo de poblaciones de microsimbiontes competitivas pero poco efectivas. Así, cuanto mayor sea la proporción de nódulos ocupados por cepas que tengan buena capacidad para nodular pero no sean buenas fijadoras, menor será el rendimiento de la FBN (Triplett and Sadowsky, 1992). Para superar esta limitación, se han desarrollado cultivares de leguminosas cuya nodulación está restringida a cepas de rizobios muy efectivas (Mpeperekí et al., 2002). Otras estrategias para mejorar la FBN, que implican al microsimbionte, consisten en un aumentar la capacidad de los rizobios para sintetizar factores *nod* (para provocar mayor número de infecciones en las raíces de las leguminosas), mejorar la asimilación de carbono por los bacteroides (y, por tanto, la producción de energía para incrementar la actividad nitrogenasa), así como la selección de cepas de rizobios que presenten mayor tolerancia a ambientes desfavorables y mayor movilidad en el suelo, lo cual favorecería la dispersión del inóculo. En este sentido, los gobiernos de países con grandes extensiones agrícolas dedicadas al cultivo de soja y otras leguminosas, como Brasil, Argentina y México están promoviendo en los últimos años la selección, desarrollo y comercialización de cepas de rizobios altamente competitivas y con alta eficiencia fijadora, como principal estrategia para mejorar la FBN y la productividad. A la hora de seleccionar una cepa de rizobio eficiente es necesario tener en cuenta además su tolerancia a estreses abióticos como sequía, temperatura y salinidad. De igual modo, el uso y la selección de especies y cultivares de leguminosas tolerantes a sequía y adaptados a las diferentes condiciones ambientales de cada región soportarán elevadas tasas de FBN (Hardason, 1994). Por ello, los programas de selección de leguminosas y rizobios encaminados a mejorar la

productividad y la sostenibilidad agrícola han de tener en cuenta los cultivos a pequeña escala de variedades locales de leguminosas, y no sólo cultivos de importancia mundial como la soja. En este sentido, hay que destacar iniciativas como el programa N2Africa (<http://www.n2africa.org/>), destinado a fomentar el uso de la fijación de nitrógeno en variedades locales de leguminosas por pequeños agricultores de países africanos en desarrollo.

D.6.2. Desarrollo de simbiosis fijadoras en cereales

Recientemente se está considerando la posibilidad de extender la capacidad para fijar nitrógeno a plantas no fijadoras de interés agrícola, tomando como modelo la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, con especial énfasis en los cereales, base de la alimentación humana. En la actualidad se conocen muchos de los aspectos moleculares y fisiológicos de la nodulación y la fijación de nitrógeno en leguminosas, y se sabe que las principales fases del establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa son similares a las fases de formación de micorrizas arbusculares (Charpentier and Oldroyd, 2010). Las micorrizas arbusculares son simbiosis que establecen hongos de los filos Glomeromycota, Basidiomycota y Ascomycota con la mayoría de especies vegetales, en las cuales el hongo favorece la absorción de agua y nutrientes para la planta, y se calcula que entre el 90 y el 95% de las plantas terrestres, tanto leñosas como herbáceas y arbustivas, establecen estas simbiosis de forma habitual (Wang and Qiu, 2006). Se cree que las simbiosis fijadoras evolucionaron a partir de las micorrizas arbusculares (Parniske, 2008), y se han caracterizado genes con funciones similares en ambas simbiosis (Charpentier and Oldroyd, 2010). Por tanto, la mayoría de los procesos necesarios en las leguminosas para la formación del nódulo (reconocimiento microorganismo-planta, señalización, oscilaciones de calcio, exocitosis para la formación del simbiosoma, etc) pueden tener lugar en la mayoría de cultivos, incluidos los cereales. Los estudios actuales en este campo están encaminados a tratar de comprender cómo la formación de micorrizas ha evolucionado hacia las simbiosis fijadoras en leguminosas, y a estudiar de forma detallada la regulación de los genes responsables de la formación del nódulo (Olivares et al., 2013; Beatty and Good, 2011). Esta línea de investigación puede permitir en un futuro la manipulación genética

de cereales como el arroz o el trigo, para que sean capaces de reconocer a los rizobios, formar estructuras similares a los nódulos y fijar nitrógeno. Además, para obtener cereales que puedan fijar nitrógeno, se requeriría transformar a los rizobios para que sean capaces de reconocer e infectar las raíces de los cereales, y crear un ambiente bajo en oxígeno en el interior de la planta que permita el funcionamiento de la nitrogenasa (ya que en micorrizas no se da este ambiente microaeróbico) (Beatty and Good, 2011).

D.6.3. Transformación genética de cereales con genes nif

Otra posibilidad que se está investigando es la introducción de genes *nif* directamente en los cereales, en orgánulos celulares como los cloroplastos o mitocondrias, mediante ingeniería genética. La obtención de cereales capaces de fijar nitrógeno es considerado uno de los mayores retos actuales de la biotecnología aplicada a la agricultura. El sistema de regulación de la síntesis y actividad de la nitrogenasa es bastante complejo, y por ello a pesar de los esfuerzos de muchos grupos de investigación que trabajan en este campo, aún no se ha conseguido que los genes *nif* se expresen en células eucariotas simples como las levaduras (Atlas and Bartha, 2002). No obstante, en la actualidad, un consorcio de investigadores de varios países colaboran en el proyecto ENSA (Enginnering Nitrogen Symbioses for Africa) (<https://www.ensa.ac.uk/home/>), financiado por la Fundación Bill and Melinda Gates, cuyo objetivo es transferir la capacidad para fijar nitrógeno a cereales como el maíz en regiones del África Sub-Sahariana mediante estas dos estrategias descritas.

Otras líneas de investigación destinadas a mejorar la fijación de nitrógeno incluyen la mejora genética y la optimización en el uso agrícola de las bacterias diazotrofas endofíticas y de vida libre asociadas con diversos cultivos de plantas no leguminosas, utilizadas comúnmente en inoculantes aplicados al campo. La aplicación práctica de todos estos estudios en un futuro supondría una producción de alimentos eficiente, y a la vez sostenible para alimentar a la creciente población humana.

E. EL AZUFRE

E.1. Ciclo biogeoquímico del azufre

El azufre (S) está presente en la naturaleza tanto en formas orgánicas como inorgánicas, interconvertibles gracias al ciclo biogeoquímico del azufre. El ciclo del azufre se compone de flujos y reacciones que transcurren en ambientes acuáticos, terrestres, y en la atmósfera, y en él participan tanto los seres vivos como los procesos geológicos y atmosféricos naturales, así como las actividades humanas agrícolas e industriales, al igual que ocurre en el ciclo del nitrógeno. Sin embargo, el ciclo del azufre presenta aún más complejidad que el del nitrógeno, debido a la variedad de estados posibles de oxidación en los que se pueden presentar el azufre, representados por los valores de valencia, que oscilan entre -2 y +6. Además, algunos de los procesos y reacciones del ciclo del azufre que permiten para pasar de uno a otro estado de oxidación pueden ser llevados a cabo tanto por procesos químicos como biológicos, y en condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas.

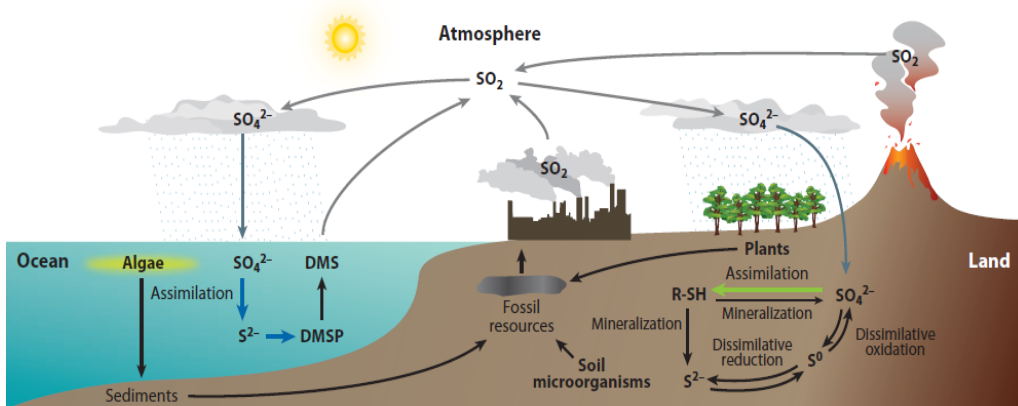


Figura 7: ciclo biogeoquímico del azufre (tomado de Takahasi et al., 2011)

Las actividades antropogénicas, especialmente la industria, constituyen una de las contribuciones más importantes al ciclo global del azufre. Los compuestos azufrados generados por la industria constituyen una de las mayores fuentes de contaminación de la atmósfera y las aguas, y entre ellos se encuentran los óxidos de azufre, (SO_x) y el sulfuro de hidrógeno (H_2S). Los óxidos de azufre son los principales

responsables de la lluvia ácida al convertirse en ácido sulfúrico, y proceden de plantas termoeléctricas y de combustión industrial, así como del refinado del petróleo y de la combustión del carbón y derivados del petróleo en las calefacciones y motores. Las principales fuentes antropogénicas de H_2S , por su parte, son la fabricación de pasta de papel, refinerías, tratamiento de aguas e industrias de curtidos textiles. Estos dos gases y sus derivados, a elevadas concentraciones, son nocivos tanto para las plantas como para la salud humana. (http://www.navarra.es/home_es/Temas/Medio+Ambiente/Calidad+del+aire/Informacion/Contaminantes/).

Sulfonatos: en ambientes terrestres, los compuestos organosulphurados más comunes son los sulfonatos y ésteres de azufre, los cuales constituyen alrededor de un 95% del contenido total de azufre en estos suelos. La desulphuración de estos compuestos por medio de arilsulfatasas y alquilsulfatasas bacterianas tiene gran importancia ecológica y agrícola, y de hecho las arilsulfatasas, que degradan los sulfonatos aromáticos liberando sulfato son uno de los enzimas más comunes en el suelo (Hummerjohann et al., 1998; Kertesz, 1999). La desulphuración es uno de los procesos de la descomposición de la materia orgánica en suelos y ácidos húmicos, es responsable de la detoxificación de compuestos xenobióticos sulfonados altamente contaminantes (como los sulfonatos de alquilbenceno o LAS presentes en detergentes y en lodos de depuradora), y además constituye la principal fuente natural de sulfato para las plantas, las cuales no son capaces de asimilar estos compuestos organosulphurados. Entre los sulfonatos de origen natural presentes en el suelo destacan el metanosulfonato, procedente de la atmósfera como producto de degradación del DMS, la taurina (2-aminoetanosulfonato), producido por muchos mamíferos, y otros presentes en las sustancias húmicas, procedentes de la descomposición de los seres vivos (Kertesz, 1999 y referencias incluidas).

Estos compuestos pueden ser utilizados como fuente de azufre por numerosos microorganismos del suelo, incluyendo los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y β -proteobacterias diazotróficas como *Burkholderia* o *Cupriavidus* (Mirleau et al., 2005; Schmalenberger and Kertesz, 2007). Recientemente, también se ha demostrado que algunos rizobios como *Sinorhizobium meliloti* y *Bradyrhizobium japonicum* también

son capaces de utilizar estos compuestos como fuente de azufre alternativa al sulfato (Sugawara et al., 2011; Wilson and Kappler, 2009).

E.2. Metabolismo del azufre en plantas

El S es uno de los seis macronutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas, constituyendo entre un 0.3 y un 0.5% de su materia seca. El azufre en las plantas cumple una importante función estructural, ya que se encuentra en los aminoácidos esenciales cisteína y metionina, que forman parte de las proteínas y otras moléculas de importancia biológica (Saito, 2004). El S es asimismo responsable de las funciones catalíticas y electroquímicas de diversas moléculas, como el transporte de electrones en los clústeres Fe/S de algunas proteínas, así como de la regulación de enzimas mediante puentes disulfuro (Hell, 1997). Además, la sulfatación (adición de grupos sulfato) es uno de los mecanismos de regulación de la actividad de enzimas y hormonas, como los brasinoesteroides y el ácido jasmónico (Hirai and Saito, 2008).

E.2.1. Compuestos azufrados en plantas

E.1.2.1. Cisteína

La cisteína ocupa una posición central en el metabolismo primario y secundario de la planta debido a sus funciones bioquímicas. Es el primer compuesto orgánico con azufre reducido sintetizado en la planta a partir de la asimilación del sulfato, así como el metabolito precursor de biomoléculas importantes en el metabolismo celular como vitaminas (como la biotina y a tiamina), sulfolípidos, hormonas, cofactores, glutatión, y compuestos de defensa como las fitoquelatinas; todas ellas contienen motivos azufrados como grupo funcional (Hell, 1997). La cisteína forma parte de las proteínas, y en ellas cumple importantes funciones catalíticas y estructurales, como se verá más adelante. Además, recientemente se ha demostrado que la homeostasis de cisteína y de sus derivados juega un papel importante en la inmunidad de la planta, la regulación de la autofagia y la regulación redox, entre otras funciones celulares (Alvarez et al., 2011; Gotor et al., 2013; Romero et al., 2014).

E.2.1.2. Metionina

La metionina se sintetiza a partir de la cisteína, y es esencial para la expresión génica, ya que su secuencia correspondiente en el ADN según el código genético, TAC, es el punto de partida para la transcripción de un gen a ARN, el cual se transcribe al codón de iniciación AUG, que es la señal para iniciar la traducción a proteína en los ribosomas (Taiz and Zeiger, 2002; Hesse, 2004a). Además, constituye el punto de partida para la síntesis de compuestos como la S-adenosil-metionina (SAM), molécula responsable de la metilación del ADN, que consiste en la unión de grupos metilo a residuos de citosina de la cadena de ADN, impidiendo su transcripción, y regulando así la expresión génica. La metilación del ADN constituye la alteración epigenética (regulación génica sin cambios en la secuencia del gen) más importante en plantas, y regula procesos de desarrollo de las plantas como la floración. La SAM actúa como donador de grupos metilo en otros procesos celulares y participa además en la síntesis de poliaminas, hormonas y vitaminas (Roje, 2006).

Desde el punto de vista nutricional, la metionina constituye la fuente de azufre más importante para los animales, puesto que éstos no pueden asimilar el azufre en su forma inorgánica, y el contenido en este aminoácido es un indicador de calidad nutritiva en los cultivos para consumo humano y animal (Amir, 2009).

E.2.1.3. Grupos tiol

En las proteínas el S es responsable de mantener su estructura terciaria y cuaternaria gracias a la formación de enlaces covalentes entre grupos tioles (sulfhidrilo), denominados puentes disulfuro (S-S) que se establecen entre los residuos de cisteína (Saito, 2004). La formación de puentes S-S por oxidación de grupos tiol es reversible, y constituye uno de los mecanismos de regulación de la actividad muchas proteínas (Meyer and Hell, 2005). La disociación y reducción de los puentes S-S de las proteínas ocurre de forma acoplada a la oxidación de glutatión, cisteína, ferredoxina u otro donador de electrones, o bien por la acción de enzimas antioxidantes denominados tiorredoxinas. Además, los grupos tioles presentes en el sitio activo de algunas enzimas son esenciales para su actividad catalítica, como ocurre en las cisteín-proteasas tipo papaína, implicadas en numerosos procesos celulares (Van der Horn et al., 2004). La

formación y disociación de puentes S-S entre dos moléculas de cisteína o glutatión son responsables de la defensa celular frente a estrés oxidativo y contribuyen a mantener la homeostasis redox; además, constituyen un mecanismo donador y receptor de electrones en numerosas reacciones de oxido-reducción (Meyer and Hell, 2005).

E.2.1.4. Glutatión

El glutatión es un tripéptido derivado de la cisteína, que presenta la estructura γ -glutamil cisteinil-L-glicina (γ -Glu-Cys-Gly), y es el tiol de bajo peso molecular más abundante en plantas, estando presente en altas concentraciones (Noctor et al., 2002). Se localiza mayoritariamente en hojas (Noctor and Foyer, 1998), aunque en leguminosas noduladas los nódulos son su principal lugar de síntesis (Morán et al., 2000). Constituye el principal compuesto de almacenamiento y transporte orgánico en las plantas, y se sintetiza a partir de la cisteína, mediante dos reacciones dependientes de ATP (Kopriva and Rennenberg, 2004). En la primera reacción la cisteína se une al glutamato mediante la γ -glutamilcisteína sintetasa para formar γ -glutamil cisteína (γ -EC), y posteriormente el γ -EC se une una molécula de glicina mediante la acción de la glutamato sintetasa (Noctor et al., 1998).

El glutatión existe como forma reducida (GSH) o como forma oxidada (GSSG), la cual se forma mediante la unión de dos moléculas de glutatión por la formación de un puente disulfuro entre los residuos de cisteína. El equilibrio entre la forma oxidada y la reducida protege a los grupos tiol de muchas proteínas, y evita su inactivación o la pérdida de su función estructural (Meyer and Hell, 2006). Además, se considera el principal responsable de la homeostásis redox de la célula, junto con el ascorbato, actuando como antioxidante y evitando el daño celular causado por las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) que se forman en situaciones de estrés oxidativo causado por perturbaciones ambientales (Foyer and Noctor, 2011). El ciclo ascorbato-glutatión, también llamado ruta Halliwell-Asada constituye uno de los sistemas antioxidantes más importantes de las plantas, y se localiza en casi todos los compartimentos celulares (Asada et al., 1992; Jiménez et al., 1997; Halliwell, 2006). Los radicales oxidantes procedentes de las ROS y RNS entran en este ciclo y son

neutralizados mediante la oxidación-reducción coordinada del ascorbato y el glutatión (Foyer and Noctor, 2011).

Además de esta función antioxidante, el glutatión participa en la detoxificación de compuestos xenobióticos como herbicidas, la defensa frente a patógenos, actúa como cofactor en numerosos procesos metabólicos, como donador de electrones y poder reductor para reacciones redox, y constituye un reservorio del azufre reducido (Foyer et al., 2001; Noctor et al., 2002; Droux et al., 2004). Además, participa en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas (Meyer and Hell, 2005; Foyer and Noctor, 2011). En leguminosas noduladas el GSH es esencial para el establecimiento de la simbiosis, y para el buen funcionamiento del nódulo, ya que en plantas mutantes deficientes en la síntesis de glutatión se inhibía la formación de nódulos (Frendo et al., 2005). Además, existe una estrecha correlación entre la capacidad para fijar nitrógeno y la concentración de GSH en el nódulo (Groten et al., 2005).

En algunas leguminosas existe también un homólogo del glutatión, denominado homoglutatión (hGSH), en el cual la glicina es sustituida por β -alanina (Price, 1957; Matamoros et al., 1999). Dependiendo de la especie y del tejido, puede estar en mayor concentración que el GSH y ser el tiol predominante: en soja y alubia el hGSH es mayoritario, mientras que en guisante y alfalfa el tripéptido predominante es el GSH (Morán et al., 2000).

E.2.1.5. Metabolitos secundarios azufrados

El S está presente además en una amplia variedad de metabolitos secundarios de las plantas con importantes funciones en la respuesta a estrés y la defensa frente a patógenos (Rausch and Wachter, 2005). Entre estos metabolitos secundarios se encuentran los glucosinolatos, producidos por las plantas de la familia *Cruciferae*, que comprende especies de interés en la agricultura y alimentación como las del género *Brassica* (coliflor, brócoli, coles, berza,...), el rábano, la mostaza, etc., además de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, y son responsables de su olor característico y su sabor picante en algunos casos (Wittstock and Halkier, 2002). Todos estos cultivos se caracterizan por un alto contenido en azufre, debido a la presencia de estos metabolitos

secundarios (Grubb and Abel, 2006). Los glucosinolatos son degradados a isotiocianatos en estas plantas en respuesta al ataque de insectos y microorganismos patógenos, y a la depredación (Rausch and Wachter, 2005). Además, en los últimos años estos cultivos han ganado importancia en la nutrición y farmacología humanas, ya que se ha demostrado en estudios invitro y en ensayos clínicos que los isotiocianatos procedentes sobre todo de plantas del genero *Brassica* tienen efectos protectores frente a varios tipos de cáncer, reduciendo su incidencia y la progresión de células tumorales (Herr and Büchler, 2010; <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/diet/cruciferous-vegetables>).

Las fitoquelatinas (PCs) son ligandos de alta afinidad por metales pesados (Cd, Pb, Cu, Hg, Zn y Cu, entre otros), implicados en la detoxificación y tolerancia de los mismos. Las PCs constituyen una amplia familia de metabolitos secundarios con la estructura general $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$. Se sintetizan a partir del glutatión o de su precursor, γ -glutamilcisteína (γ -EC), y se componen de un número variable n de repeticiones (de 2 a 11) del dipéptido γ -Glu-Cys con una glicina terminal (Zenk, 1996; Rauser, 1999). Gracias a su capacidad para secuestrar metales pesados, impiden su acumulación interna y su toxicidad, de manera que este proceso reduce de 10 a 1000 veces la toxicidad de los metales pesados en el citosol (Sirko and Gotor, 2007). Su síntesis se estimula por la presencia en el medio de estos, y por ello resultan de gran interés para el uso de plantas en la fitorremediación de suelos contaminados (Maldonado et al., 2000; Cobbett and Goldsbrough, 2002).

Otros metabolitos secundarios azufrados con funciones de defensa en las plantas incluyen los alil-sulfóxidos de cisteína presentes en el ajo y la cebolla, responsables de su sabor picante y sus propiedades antimicrobianas y terapéuticas (Leustek, 2002), así como las defensinas, péptidos ricos en cisteína distribuidos ampliamente en plantas y animales, con propiedades antimicrobianas y antivíricas (Broekaert et al., 1995).

E.2.2. Fases de la asimilación de sulfato y biosíntesis de cisteína

En el proceso de asimilación del sulfato, esquematizado en la figura 8, se pueden distinguir cuatro etapas fundamentales: transporte de sulfato al interior celular, activación del sulfato, reducción a sulfuro, e incorporación del azufre a esqueletos carbonados (síntesis de cisteína).

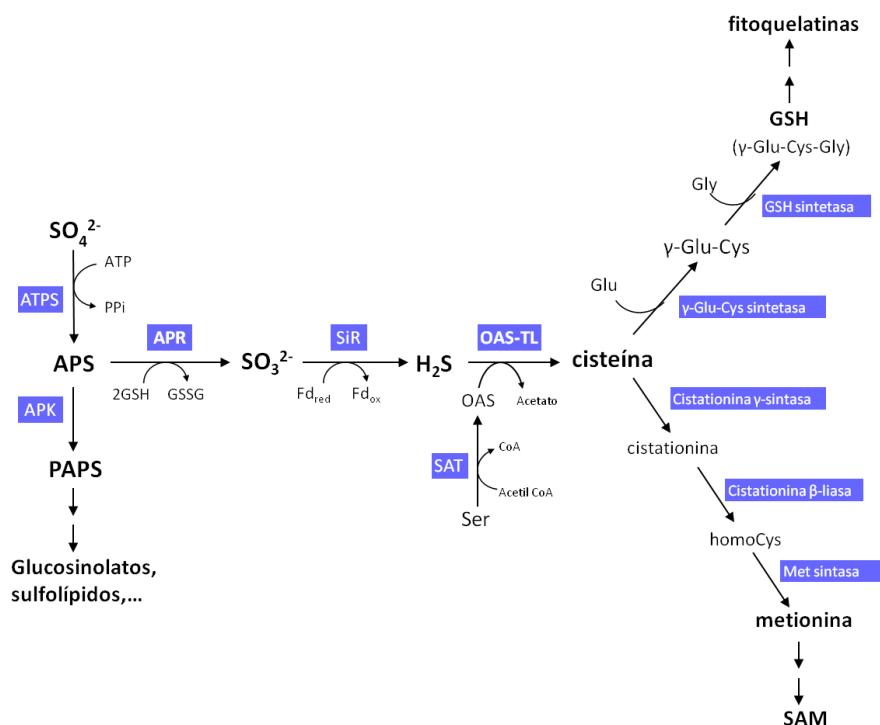


Figura 8: esquema resumido del metabolismo del azufre en plantas y de los principales metabolitos azufrados. ATPS: ATP sulphurilasa; APS: adenosin5'-fosfosulfato; APR: APS reductasa; APK: APS quinasa; PAPS: fosfoadenosin 5'-fosfosulfato; SiR: sulfito reductasa; SAT: serín-acetil tranferasa; OASTL: O-acetilserin(tiol)liasa; GSH: glutatión; SAM: S-adenosilmetionina.

E.2.2.1. Transporte de sulfato

La captación de sulfato se realiza a través de las raíces y se distribuye al resto de la planta. El transporte de sulfato a través de la membrana plasmática de las células ocurre contra gradiente, gracias al co-transporte de H^+ y a una ATPasa de protones de la membrana, ya que el potencial eléctrico intracelular es extremadamente negativo (Saito, 2004), y es considerado como el paso más regulado de la ruta de asimilación de S en la planta. La actividad de los diferentes transportadores de azufre está regulada de manera coordinada para evitar una acumulación excesiva de sulfato en el citoplasma

(Hawkesford and de Kok, 2006). En las plantas existen entre 12 y 16 genes que codifican para transportadores de sulfato, algunos redundantes, caracterizados sobre todo en *Arabidopsis* y *Oriza sativa* (arroz) (Hawkesford, 2003; Takahasi et al., 2011). La familia génica de transportadores de sulfato se ha clasificado en *Arabidopsis* en cinco grupos funcionales atendiendo a su similitud en la secuencia peptídica, localización subcelular y en la planta y funciones fisiológicas (Buchner et al., 2004; Hawkesford and de Kok, 2006). Los transportadores del grupo SULTR1 son transportadores de alta afinidad, inducibles por deficiencia de sulfato y localizados sobre todo en los pelos radicales y en las células corticales. Se consideran por ello los principales responsables de la toma de sulfato del suelo (Takahasi et al., 2011).

Los transportadores SULTR2 son de baja afinidad por sulfato y se localizan en tejidos vasculares, estando involucrados en el transporte a larga distancia desde la raíz a otros tejidos (Takahasi et al., 2011).

Los transportadores pertenecientes al grupo 3 han sido menos estudiados, y su actividad como transportadores de sulfato aún no ha sido confirmada. Se ha localizado un homólogo de uno de estos transportadores, AtSultr3;5, en la membrana del simbiosoma de nódulos de *Lotus japonicus*, y se ha demostrado que es esencial para el transporte de sulfato a los bacteroides y para una fijación eficiente en *Lotus* (Krusell et al., 2005).

Los transportadores pertenecientes a los grupos 1-3 se localizan en la membrana plasmática, sin embargo los del grupo SULTR4 son específicos de la membrana del tonoplasto. Estos transportadores permiten la salida de sulfato desde la vacuola al citosol (Hawkesford and de Kok, 2006), y su expresión se induce en condiciones de limitación de azufre (Kataoka et al., 2004).

La función de los transportadores del grupo 5 aún no se ha establecido. Asimismo, se desconocen aún los sistemas de transporte de sulfato al interior del cloroplasto. Además de estos transportadores específicos para sulfato, otros transportadores de amplio rango para aniones y permeasas podrían también permitir el transporte del sulfato dentro de las plantas, si bien aún no se ha confirmado (Saito, 2004).

E.2.2.2. Activación de sulfato

Una vez en el interior de la planta, el sulfato puede ser almacenado en las vacuolas de las raíces y hojas, o bien ser asimilado, siendo las concentraciones de cisteína y glutatión las que parecen regular la cantidad de sulfato que se asimila o se almacena (Bolchi et al., 1999). Debido a la estabilidad del sulfato y al alto potencial redox necesario para su reducción directa a sulfito, en condiciones fisiológicas el sulfato debe activado previamente mediante la unión a una molécula de ATP o adenilación, que constituye la única vía de entrada de sulfato a las rutas metabólicas celulares (Hawkesford et al., 2006). La activación del sulfato está mediada por el enzima ATP sulphurilasa (ATPS, EC 2.7.7.4) en presencia de Mg^{+2} , obteniéndose como producto de la reacción adenosín-5'-fosfosulfato (APS), que es la forma activa del sulfato en los seres vivos, y liberándose PP_i . El enlace entre el sulfato y el grupo fosfato del ATP es de alta energía, y permite la posterior reducción del sulfato (Bermúdez, 2011). En plantas existen diversas isoformas de ATPS, localizadas sobre todo en cloroplastos y en el citosol, y su expresión y actividad se han caracterizado en hojas de *Arabidopsis* (Klonus et al., 1995; Takahasi et al., 2011) y de espinaca, (Lunn et al., 1990). Por esta razón se creía que la asimilación del sulfato ocurre principalmente en tejidos fotosintéticos, tras ser transportado desde la raíz vía apoplasto y simplasto gracias al flujo xilemático de la transpiración (Hawkesford and de Kok, 2007). Sin embargo, hay numerosos estudios que demuestran que en la raíz tiene lugar una parte importante de la asimilación de azufre en plantas (Hatzfeld et al., 2000; Phartiyal et al., 2006). Además, la ATPS ha sido detectada en un estudio proteómico en nódulos de *Medicago truncatula* junto con otros enzimas de la asimilación y metabolismo del azufre (Larrainzar et al., 2007), sugiriendo que los nódulos también pueden tener un importante papel en la asimilación de azufre en leguminosas.

La ATPS también cataliza la reacción reversa, es decir, la formación de ATP y sulfato a partir de APS, siendo este sentido más favorable energéticamente que el de la síntesis de APS. Por ello, el APS y el PP_i deben ser rápidamente metabolizados para evitar esta reacción reversa. El APS puede seguir dos vías metabólicas: la mayor parte se utiliza para la asimilación de azufre y es reducido para formar sulfito, pero también

puede ser fosforilado mediante la APS quinasa (APK, EC 2.7.1.25) para formar fosfoadenosín 5'-fosfosulfato (PAPS), que en plantas actúa como donador de sulfato activado en numerosas reacciones de sulfatación de hormonas y metabolitos secundarios como glucosinolatos o sulfolípidos (Wittstock and Halkier, 2002).

E.2.2.3. Reducción del sulfato activado a sulfuro

La reducción de sulfato activado ocurre en los cloroplastos en prácticamente todos los organismos fotosintéticos (plantas, algas verdes y cianobacterias) (Patron et al., 2008). En *Arabidopsis* y otras plantas vasculares estudiadas esta reducción se realiza en dos etapas: en la primera, el APS es reducido a sulfito mediante la APS reductasa (APR; EC 1.8.99.2), y posteriormente el sulfito es reducido hasta sulfuro por medio de la sulfito reductasa (SiR; EC 1.8.7.1). En la mayoría de organismos fotosintéticos la APR está codificada por una pequeña familia multigénica, y existen al menos dos isoformas de APR, localizadas sobre todo en cloroplastos de hojas (Patron et al., 2008), aunque también se ha detectado la expresión de APR en plastidios de raíces (Hopkins et al., 2004). En esta reacción, el poder reductor y los electrones necesarios para la reducción del sulfato proceden de la formación de un puente S-S entre dos moléculas de glutatión reducido (GSH).

El sulfito producido por la APS reductasa es reducido a sulfuro mediante la transferencia de seis electrones en la reacción catalizada por la sulfito reductasa, dependiente de ferredoxina como donador de electrones y poder reductor. En organismos no fotosintéticos y en raíces, el donador de electrones es el NADPH, puesto que la fuente principal de ferredoxina es la fotosíntesis (Leustek et al., 2000; Nakayama et al., 2000). La SiR es una hemoproteína formada por 2-4 subunidades idénticas, y cada una de ellas contiene un grupo sirohemo y un centro Fe/S como grupo prostético (Krueger and Siegel, 1982). Al contrario que ocurre con el resto de enzimas de la asimilación del azufre, sólo existe una isoforma de SiR en casi todos los organismos fotosintéticos (Kopriva et al., 2007; Khan et al., 2010), se expresa de forma constitutiva (Bork et al., 1998) y su secuencia de aminoácidos está muy conservada entre todas las plantas (Bermúdez, 2011).

E.2.2.4. Incorporación del azufre a esqueletos carbonados: enzima OASTL

El sulfito generado en la etapa anterior es el sustrato para la biosíntesis de cisteína. El sulfuro libre se integra en un esqueleto carbonado mediante la acción sucesiva de dos enzimas denominadas serina acetil-transferasa (SAT; EC 2.1.3.30) y O-acetilserin(tiol)liasa (OASTL; EC: 4.2.99.8) localizados en los tres compartimentos principales de las células vegetales: citosol, mitocondria y cloroplasto (Saito, 2004). En la primera reacción, la L-serina es activada mediante acetilación por la SAT, generándose O-acetilserina, y utilizando acetil-Co-A como donador del grupo acetilo. En el segundo paso, la OAS reacciona con el sulfuro para dar L-cisteína, gracias a la acción de OASTL.

En *Arabidopsis* se han identificado cinco genes *SAT* (Howarth et al., 2003) y nueve genes *OASTL* (Wirtz et al., 2004). De todas las isoformas de OASTL, la más abundante es la citosólica, codificada por el gen *OAS-A1* y la isoforma mayoritaria en el cloroplasto es la codificada por el gen *OAS-B*, mientras que la OAS-C es la isoforma mitocondrial (Saito, 2004). El enzima OASTL es un homodímero de 60-70 KDa que requiere piridoxal 5'-fosfato (PLP) como cofactor para su actividad catalítica (Saito, 2004), y pertenece a una familia de enzimas que catalizan reacciones de sustitución en la posición β de los aminoácidos. Además de la actividad OASTL se han atribuido otras funciones a alguna de las isoformas. Por ejemplo, algunas isoformas citosólicas y del cloroplasto presentan actividad β -cianoalanina sintasa, entre ellas ATCYS-C1, que participa en la detoxificación de cianuro (Hatzfield et al., 2000), y es esencial para el correcto desarrollo de los pelos radicales en *Arabidopsis* (García et al., 2010). Otras isoformas minoritarias de la familia de OASTL incluyen la citosólica DES1, y la isoforma plastídica CS26 (Romero et al., 2014). DES1 es una L-cisteína desulfhidrasa caracterizada recientemente, que cataliza la desulphuración de cisteína en el citosol, liberando sulfuro, piruvato y amonio como productos de la reacción (Alvarez et al., 2010), y se ha demostrado que es esencial para mantener la homeostasis de cisteína, así como para modular la concentración de sulfuro en el citosol, importante en procesos de señalización celular (Alvarez et al., 2012; Romero et al., 2013). La acción coordinada de OAS-A1 y DES1 en el citosol es esencial para mantener una baja concentración de cisteína en la célula (del orden μM), ya que ésta puede ser tóxica a concentraciones del

rango micromolar debido a su alto poder reductor (Romero et al., 2014). La proteína cloroplástica CS26 tiene actividad S-sulfocisteína sintasa, y cataliza la formación de sulfocisteína a partir de OAS y sulfocisteína (Bermúdez et al., 2010). Esta isoforma fue descrita en plantas recientemente, y juega un papel importante en la fotosíntesis y el funcionamiento del cloroplasto, actuando probablemente como un sensor del estado redox del mismo (Bermúdez et al., 2012; Gotor and Romero, 2013)

En plantas y bacterias, los dos enzimas, SAT y OASTL se asocian formando el complejo cisteína sintasa (Saito, 2004; Wirtz and Hell, 2006). La formación de este complejo es reversible, y la unión y disociación de los dos enzimas constituye un importante mecanismo de regulación de la síntesis de cisteína. En la célula, la concentración de OASTL es hasta 300 veces mayor que la de SAT (Droux et al., 1998), siendo la enzima SAT activa solamente cuando forma parte del complejo. Por otro lado, la enzima OASTL se inactiva cuando forma parte del complejo (Hindson and Shaw, 2003), y parece que actúa como regulador de la actividad SAT, modificando su estabilidad y propiedades catalíticas. La fracción OASTL libre es catalíticamente activa y, por tanto, responsable de la formación de cisteína. Además, se ha demostrado que la actividad OASTL excede a la SAT en todos los compartimentos celulares, indicando que la enzima SAT está en su totalidad formando parte del complejo cisteína sintasa junto con una pequeña fracción del total de proteína OASTL (Heeg et al., 2008).

La mayor parte de la actividad SAT se localiza en la mitocondria, mientras que la síntesis de cisteína se realiza predominantemente en el citosol, ya que la actividad de la isoforma OAS-A1 representa el 40% del total de la actividad OASTL en hojas, y el 80% en raíces (Heeg et al., 2008; López-Martín et al., 2008; Watanabe et al., 2008).

E.2.3. Regulación de la biosíntesis de cisteína

E.2.3.1. Factores ambientales y modulación de señales internas

La captación y asimilación de sulfato están fuertemente reguladas en función de la demanda de azufre de la planta en cada momento de desarrollo, de la disponibilidad de azufre y de los factores ambientales. La influencia de estos factores en el metabolismo del azufre, así como su interconexión con el metabolismo del carbono y

del nitrógeno ha sido ampliamente estudiada y recogida en varios trabajos y revisiones (Hesse et al., 2004b; Koprivova et al., 2000; Kopriva and Rennenberg, 2004; Hawkesford and De Kok, 2006; Takahasi et al., 2011; y referencias incluidas). Las rutas de asimilación del nitrógeno y del azufre están íntimamente relacionadas, y se regulan mutuamente. Así, el nitrato y las formas reducidas de nitrógeno actúan como metabolitos reguladores de enzimas de la ruta de asimilación de azufre, y a la inversa, el sulfato y las formas reducidas de azufre regulan ciertas enzimas de la asimilación del nitrógeno. Puesto que ambas rutas convergen en la síntesis de proteínas, su recíproca regulación permite coordinar las velocidades de asimilación del nitrógeno y del azufre para la producción de las cantidades adecuadas de metabolitos azufrados y aminoácidos (Maldonado et al., 2000). Además, la cisteína es el primer compuesto en el metabolismo de la planta que contiene tanto azufre como nitrógeno, y por lo tanto su biosíntesis depende de la integración y el control de ambas rutas metabólicas y también de la fotosíntesis y la asimilación de carbono (Hesse et al., 2004b). La interacción y regulación entre el metabolismo del carbono, del nitrógeno y del azufre también es importante para la síntesis de glutatión, y tiene aún mayor complejidad que la regulación de la síntesis de cisteína, ya que depende de la disponibilidad de los aminoácidos que lo componen: glutamato, glicina y cisteína (Kopriva and Rennenberg, 2004).

El control de la asimilación del azufre ocurre principalmente a nivel de la captación de sulfato y de reducción de APS, donde la expresión de los genes de transportadores de sulfato y APR están regulados por la disponibilidad de sulfato (Yoshimoto et al., 2007; Schereer et al., 2010). Además, la SiR y la SAT mitocondrial parecen estar implicados también en el control del metabolismo del azufre (Yoshimoto et al., 2007; Haas et al., 2008). Los intermediarios y productos de la ruta de asimilación son los reguladores más comunes, y así, el transporte de sulfato y las actividades APR y γ -EC sintasa sufren inhibición feedback por GSH (Vauclare et al., 2002; Hothorn et al., 2006; Takahasi et al., 2011), mientras que OAS es un regulador positivo de la ruta, ya que se acumula en condiciones de deficiencia de sulfuro y afecta a la expresión de los genes de transportadores y APR (Hirai et al., 2003; Koprivova et al., 2008; Takahasi et al., 2011).

En *Arabidopsis* se ha demostrado que la isoforma citosólica OAS-A1 tiene una función específica en las respuestas de defensa de la planta frente a diferentes tipos de estreses como salinidad y presencia de metales pesados (Barroso et al., 1999; Domínguez-Solís et al., 2001), y la inducción de OAS-A1 en condiciones de estrés salino está mediada por ABA, entre otros factores (Barroso et al., 1999). También se ha demostrado que esta proteína está involucrada en la respuesta de la planta a estrés por metales pesados, produciéndose una acumulación del transcrito y del contenido de GSH. Estos resultados se correlacionan con una mayor demanda de cisteína en estas condiciones, requerida para la síntesis de GSH y fitoquelatinas, ya que ambos compuestos están implicados en la detoxificación de metales. Esto se demostró con plantas de *Arabidopsis* transgénicas en las cuales el gen de OAS-A1 estaba sobreexpresado, que les confería una mayor tolerancia a metales pesados como el cadmio (Dominguez-Solís et al., 2004). La expresión de los genes de SAT también se induce en presencia de cadmio, por lo que estos dos enzimas podrían formar un mecanismo de defensa de las plantas frente a metales (Howarth et al., 2003).

La síntesis de cisteína también se induce como respuesta a otros factores ambientales que causan estrés oxidativo, como sequía, temperaturas extremas, alta irradiancia, salinidad, ozono, herbicidas y estrés osmótico, entre otros, así como frente a ataques de patógenos y otros estreses bióticos. Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS) generadas a causa del estrés oxidativo generan daño celular e inhibición de enzimas en las plantas, las cuales desarrollan mecanismos y moléculas antioxidantes para evitar la acción dañina de las ROS. El glutatión y las fitoquelatinas son dos de los compuestos antioxidantes y quelantes más importantes en plantas, y por ello hay una gran demanda de cisteína para su síntesis en todas las situaciones de estrés oxidativo (North and Kopriva, 2007). La actividad de OAS-A1 también puede ser inhibida hasta en un 90% por la acción directa de RNS como el radical nitrito o el peroxinitrito, mediante la nitración de los residuos de tirosina de su secuencia (Álvarez et al., 2011).

Además, como ya se ha comentado, algunos metabolitos secundarios de defensa de las plantas, como los glucosinolatos, aliinas y defensinas contienen azufre, por lo que la asimilación de sulfato se activa en respuesta al ataque de patógenos y

depredadores para sintetizar estos compuestos, como parte de la respuesta inmune (Rausch and Wachter, 2005; Hell and Krause, 2007).

Respecto al efecto de la sequía en la asimilación y metabolismo del azufre, hay pocos estudios hasta la fecha, a pesar de que la falta de agua constituye el estrés abiótico más importante y el que causa mayores pérdidas en productividad agrícola. Como otros estreses abióticos, la sequía provoca un aumento de la demanda de glutatión como antioxidante, por lo que en general el estrés hídrico induce la expresión y actividad de los enzimas responsables de la síntesis de cisteína y glutatión (Chan et al., 2003). Respecto a otros enzimas involucrados en el metabolismo del azufre, Larrainzar et al. (2007; 2009) observaron una reducción significativa en los niveles de metionina sintasa (enzima que cataliza el último paso de la síntesis de metionina) y de SAM sintetasa en estudios proteómicos y metabolómicos en nódulos de *Medicago truncatula* sometidos a estrés hídrico, sugiriendo un posible papel del metabolismo del azufre en la respuesta a sequía. Posteriormente se comprobó que este descenso en Met sintasa y SAM sintetasa está acompañado de un descenso en el contenido y expresión de otros enzimas responsables de la síntesis de SAM y etileno (Larrainzar et al., 2014), por lo que los autores sugieren que esta respuesta estaría relacionada con el papel del etileno en situaciones de estrés.

Se ha descrito también que algunas hormonas juegan un papel importante en la asimilación de sulfato, sobre todo aquellas hormonas relacionadas con el estrés, tales como jasmonatos, ácido abscísico y salicilatos, así como compuestos que contienen azufre y que tienen una función importante en la defensa de la planta (Rausch and Wachter, 2005). La síntesis de jasmonatos y el metabolismo del azufre están regulados de forma recíproca, de forma que los jasmonatos inducen la expresión de genes de la asimilación del sulfato, y a su vez los genes para la síntesis de jasmonatos se inducen en condiciones de limitación de azufre (Jost et al., 2005; Nikiforova et al., 2005). Por otro lado, el ácido abscísico (ABA) induce específicamente la OASTL citosólica (Barroso et al., 1999), pero reduce la actividad de APR (Koprivova et al., 2002), y la adición de salicilatos produce un aumento en los niveles de GSH (Fodor et al., 1997). Además, tanto jasmonatos como salicilatos inducen la acumulación de ARNm y la actividad APR (Kopriva et al., 2009).

E.2.3.2. Regulación del complejo cisteína sintasa

En plantas, la coordinación adecuada del complejo cisteína sintasa es un punto de control importante de la ruta de asimilación de sulfato (Hawkesford et al., 2006). La formación del complejo es reversible y la interacción de las dos enzimas se ve fuertemente afectada por la concentración de OAS y sulfuro, de manera que el sulfuro induce su formación, mientras que OAS favorece la disociación (Figura 9). La estabilidad del complejo es posible gracias a que el sulfuro mantiene activa a la SAT cuando forma parte del mismo, siempre que la disponibilidad de sulfato no sea limitante (Droux et al., 1998; Wirtz and Hell, 2006). En condiciones de limitación de azufre, los niveles de sulfuro descienden y OAS se acumula, provocando la desestabilización y disociación del complejo, acompañadas de una reducción de la actividad SAT. Además, la OAS contribuye indirectamente a la regulación transcripcional de la captación y reducción de sulfato, ya que reacciona con el sulfuro presente gracias a la OASTL libre, provocando un aumento de los niveles de cisteína y glutatión, los cuales reprimen la expresión de enzimas de la asimilación de sulfato (Smith et al., 1997; Koprivova et al., 2000; Hirai et al., 2003; Wirtz and Hell, 2006). Además, la isoforma SAT citosólica está regulada mediante inhibición feedback por cisteína (Bermúdez, 2011).

En este sentido, Hawkesford et al. (2006) propusieron un modelo para el control de la disociación/asociación del complejo cisteína sintasa, regulado en función de varios factores, entre ellos la disponibilidad de azufre, la demanda de cisteína para la síntesis de proteínas o metabolitos secundarios, los niveles de sulfuro en la célula, o cambios en el metabolismo del nitrógeno.

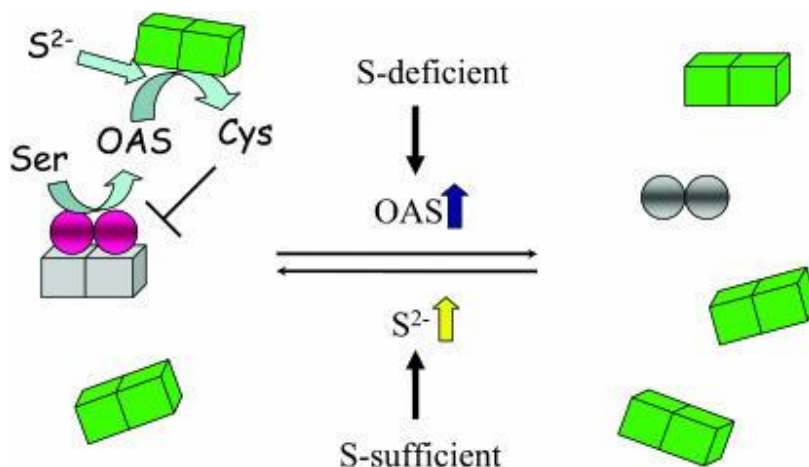


Figura 9: regulación del complejo cisteína sintasa en respuesta a la disponibilidad de azufre. La concentración de OASTL (cubos verdes) está en exceso con respecto a la de SAT (círculos rosas), hasta 300 veces. La SAT es mucho más activa cuando está unida a OASTL, y la fracción de OASTL libre cataliza la formación de cys, la cual inhibe la actividad de SAT cuando se encuentra en exceso (feedback). La deficiencia de azufre causa un aumento del OAS libre, que provoca la disociación del complejo. La forma libre de SAT tiene mucha menos actividad que la unida al complejo. Cuando aumenta el suministro de azufre se acumula sulfuro, el cual promueve la formación del complejo. Tomado de: Saito (2004).

E.3. Metabolismo del azufre en bacterias

El metabolismo del azufre en bacterias es bastante similar al de las plantas, y ha sido extensamente estudiado en las enterobacterias *Escherichia coli* y *Salmonella entérica*. La asimilación se produce preferentemente en forma de sulfatos y tiosulfatos ($S_2O_3^{2-}$), y posteriormente se utilizan para la biosíntesis de cisteína, a través de una ruta similar a la que existe en plantas. Se han identificado al menos 22 genes relacionados con el transporte y asimilación de sulfato en estas bacterias (Kreditich, 1996), y en casi todas las bacterias estudiadas estos genes se encuentran agrupados en el operón *cys* (Kertesz, 2001). Entre ellos, se han caracterizado varios transportadores bacterianos de sulfato, casi todos de tipo ABC y permeasas (Aguilar-Barajas et al., 2011). En otros géneros de bacterias como *Yersinia*, *Bacillus* y *Pseudomonas*, los transportadores de sulfato son homólogos a los de plantas, y el transporte de sulfato se realiza también mediante co-transporte con H^+ (Kertesz, 2001). No obstante, aún no se ha caracterizado ningún sistema de transporte de sulfato en rizobios.

En situaciones de limitación de sulfato, tiosulfato o cisteína, muchas bacterias son capaces de utilizar sulfonatos y otros compuestos orgánicos azufrados. Al igual que el sulfato, estos compuestos tienen que ser metabolizados hasta cisteína para su asimilación. Los genes que codifican para el transporte y asimilación de estos compuestos a cisteína o sulfuro se activan únicamente en situaciones de limitación de azufre, y entre ellos se han caracterizado transportadores específicos para taurina y otros para sulfonatos alifáticos en varias especies (Van der Ploeg et al., 2001). Los sistemas de transporte y asimilación de compuestos organosulphurados fueron también caracterizados en *Bradyrhizobium japonicum* (Sugawara et al., 2011), y se observó además que también se reprimían en presencia de cisteína.

E.3.1. Asimilación de sulfato. APS reductasa

En bacterias, el sulfato tiene que ser también activado como paso previo a su asimilación. Al igual que en plantas, el sulfato se une a ATP para formar APS. Los organismos fotosintéticos utilizan el APS directamente como forma activa de sulfato, y lo reducen hasta sulfito mediante la APS reductasa (APR). En *E. coli* y muchas otras bacterias asimiladoras de sulfato, además de en hongos, el APS es fosforilado por segunda vez para formar PAPS, el cual se reduce hasta sulfito por medio de la PAPS reductasa, codificado por el gen *cysH*. Hasta hace poco se creía que esta era la única vía de asimilación del sulfato en procariotas. No obstante, en los últimos años se han caracterizado genes *cysH* de varias especies cuyos productos muestran mayor homología con la secuencia de aminoácidos de la APS reductasa de plantas que con la PAPS reductasa de *E. coli* (Bick et al., 2000), a pesar de que su secuencia génica es homóloga a la del gen *cysH* de *E. coli*. Entre estas bacterias se encuentran géneros como *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Streptomyces*, además de especies de rizobios como *Sinirrhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti* y *Bradyrhizobium japonicum* (Kopriva et al., 2002). Además, los ensayos enzimáticos llevados a cabo por Abola et al. (1999) confirmaron que el producto del gen *cysH* de *S. meliloti* y otros rizobios, entre ellos *R. leguminosarum*, cataliza la reducción de APS.

E.4. Deficiencia de azufre

E.4.1. Causas de la deficiencia de azufre en agricultura

En sistemas agrícolas, las principales fuentes de S para las plantas son:

- A través de fertilizantes basados en sales de sulfato (principalmente NaSO_4) y, en menor medida, como azufre elemental (S^0), añadidos al suelo o mediante aplicación foliar.
- Por mineralización de compuestos orgánicos azufrados como sulfonatos y ésteres de azufre, que constituyen alrededor del 95% del azufre en el suelo (ver apartado E.1.1.3), llevada a cabo por microorganismos del suelo, los cuales liberan sulfato fácilmente asimilable por las plantas.
- Mediante absorción foliar de dióxido de azufre (SO_2) y sulfuro de hidrógeno (H_2S) procedentes de emisiones industriales, bien en forma gaseosa o disueltos en forma de lluvia ácida.

Los efectos de la deficiencia de azufre en las plantas son bien conocidos desde hace tiempo, sin embargo en agricultura no se le había prestado mucha atención debido a que, en general, los requerimientos de azufre de los cultivos estaban bien cubiertos mediante estas tres fuentes. En los últimos 30 años, sin embargo, la disponibilidad de azufre para las plantas en los suelos agrícolas ha ido disminuyendo paulatinamente, y la deficiencia de azufre se ha convertido en una de las limitaciones más importante en agricultura, sobre todo en regiones industrializadas de Europa Central y Occidental (Scherer, 2001). Al mismo tiempo, los requerimientos de S de los cultivos siguen aumentando, debido a una mayor demanda en la producción agrícola para alimentar a la creciente población humana (Scherer, 2009). Las principales razones de este descenso están relacionadas con las tres principales fuentes de azufre antes mencionadas: uso de fertilizantes con menor contenido en azufre, descenso de las emisiones antropogénicas con azufre y menor mineralización de compuestos orgánicos azufrados por el uso de la agricultura intensiva, que afecta a la diversidad y la concentración de microorganismos mineralizadores en el suelo.

- Fertilizantes con menor contenido en azufre: Los superfosfatos, con un alto contenido del fósforo y calcio fueron de los primeros fertilizantes fosfatados de

síntesis química, y se usaron ampliamente en el siglo XX. Para su fabricación se emplea ácido sulfúrico y su contenido en S oscila entre del 10 - 14% (McGrath et al., 2002). Sin embargo en la actualidad se ha abandonado el uso de estos fertilizantes debido a su alto coste y a la alcalinización del suelo que producen, que disminuye la disponibilidad de algunos micronutrientes. En general, los fertilizantes utilizados hoy en día contienen poco azufre, aunque se aplican sales de sulfato como enmiendas al suelo cuando aparecen problemas de deficiencia en los cultivos (Hagstrom, 1986; Scherer, 2001). Los pesticidas y fungicidas también presentan menor contenido en azufre elemental que hace unos 20 años, debido a su toxicidad ambiental.

- Descenso en las emisiones antropogénicas: En muchas regiones industrializadas, de Centroeuropa y Estados Unidos, las emisiones industriales a la atmósfera han sido restringidas en gran medida desde el año 1990 (Stern, 2005), entre ellas los dióxidos de azufre y el sulfuro de hidrógeno (ver apartado 5.1.). La reducción en las emisiones de gases de azufre varía de unas regiones a otras, y se deben a regulaciones más estrictas de la legislación ambiental y a la aparición de nuevas normas de calidad ambiental, como las ISO 14000. Como resultado, en la mayoría de países europeos las emisiones industriales han disminuido más de un 60% entre los años 1990 y 2004, lo cual ha supuesto numerosas mejoras para el medio ambiente y la salud humana, por un aumento en la calidad del aire y de las aguas. No obstante, también ha traído consigo la aparición de deficiencias de azufre en cultivos de estas regiones industrializadas, que dependían en parte de estas emisiones y de la lluvia ácida como fuente de azufre (Zhao et al., 1999).
- Agricultura intensiva: La mineralización de compuestos orgánicos de azufre por medio de las sulfatasas microbianas es necesaria para proporcionar sulfato asimilable por las plantas. La descomposición de sulfonatos y ésteres de azufre depende de una gran diversidad de microorganismos que utilizan estos compuestos como fuente de carbono y azufre y liberan el S sobrante en forma de sulfatos. La rotación de cultivos y la aplicación de fertilizantes naturales favorecen la diversidad y actividad de estos microorganismos (Klose et al., 1999; Kotkova et al., 2008), pero en la actualidad la agricultura intensiva y el monocultivo se imponen a la

rotación por ser más rentables (Scherer, 2009). Por lo tanto, estas prácticas agrícolas junto con la aplicación desmesurada de pesticidas han provocado un descenso en la población microbiana responsable de la mineralización y en su actividad sulfatasa, lo que ha originado suelos agrícolas aún más empobrecidos en sulfato.

E.4.2. Consecuencias de la deficiencia de azufre

Los efectos de la deficiencia de S en plantas se encuentran bien caracterizados, sobre todo en cultivos de interés agrícola y en *Arabidopsis* (Scherer, 2001; Lewandowska and Sirko, 2008; Nikiforova et al., 2005). La falta de azufre causa una inhibición de la síntesis de proteínas, y afecta a la asimilación del nitrógeno (Hawkesford and de Kok, 2006). Uno de los efectos más visibles de la falta de azufre es una inhibición en la fotosíntesis, causada por un descenso en los niveles de SAM y de sulfolípidos, precursores de la clorofila (Lewandowska and Sirko, 2008), lo que ocasiona clorosis (amarilleo) en las hojas. Otro efecto fisiológico común es un desequilibrio en la relación raíz/parte aérea, ya que se estimula la formación y crecimiento de las raíces laterales para aumentar la absorción del azufre presente en el suelo. Además, en condiciones de limitación de azufre disminuye drásticamente el contenido en compuestos azufrados implicados en la defensa las plantas frente a patógenos y condiciones ambientales adversas, por lo que se vuelven más vulnerables a estos estreses (Rausch and Wachter, 2005).

Así, el déficit de azufre tiene un impacto importante en la productividad agrícola ya que inhibe el crecimiento de la planta y el llenado del grano en cereales, causando pérdidas en productividad (Scherer, 2001). Además, influye en la calidad y las propiedades de los productos derivados de los cereales: por ejemplo, la falta de azufre provoca cambios en la composición de las proteínas del gluten de la harina de trigo, lo cual afecta a la calidad panadera de la misma (Zhao et al., 1999). En cebada, altera las reacciones enzimáticas que tienen lugar durante el proceso de malteado, y por lo tanto, afecta a la calidad de la malta cervecera (Zhao et al., 2006). Además, un bajo contenido en azufre en trigo y patata puede incrementar el riesgo de que se produzca acrilamida, un compuesto cancerígeno, durante el horneado y el procesado de ciertos alimentos (Mutucumaru et al., 2013; Elmore et al., 2008). En general, ocasiona un descenso en

los niveles de metionina y cisteína, lo cual afecta a la calidad nutritiva de los cultivos para alimentación humana y animal. Este descenso está acompañado de un aumento de la concentración de aminoácidos ricos en N, como arginina, asparragina o glutamina, en casi todas las especies estudiadas (Nikiforova et al., 2005, y referencias incluidas). No obstante, los requerimientos de azufre de las plantas así como los síntomas y efectos que produce su falta varían enormemente según la especie y el estado de desarrollo (Scherer et al., 2001). Por ejemplo, la demanda de azufre es mucho mayor en crucíferas, debido a la presencia de glucosinolatos, y en especies de *Brassica* como el brócoli, un aporte subóptimo de azufre tiene efectos drásticos en el crecimiento, la productividad y el contenido en glucosinolatos, y por tanto disminuye su calidad y su efecto anticancerígeno (Schonhof et al., 2007).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El mayor problema de la FBN en sistemas agrícolas es su alta sensibilidad a condiciones ambientales adversas; de entre ellas la deficiencia de azufre ha sido muy poco estudiada. Asimismo, a pesar de la importancia del metabolismo del azufre, tanto en plantas como en bacterias, existe poca información acerca de la regulación de esta ruta en leguminosas noduladas y en rizobios. Por ello, en este trabajo se planteó como objetivo general profundizar en la relación entre el metabolismo del azufre y la simbiosis fijadora *Pisum sativum* – *Rhizobium leguminosarum*.

Para ello, el presente estudio se ha estructurado en tres capítulos, cada uno de los cuales desarrolla un objetivo específico.

1) Caracterizar las respuestas fisiológicas de plantas de guisante a la falta de azufre cuando ésta es impuesta en dos momentos de desarrollo del nódulo y estudiar su relación con las alteraciones que produce el déficit de azufre en el metabolismo del carbono y nitrógeno en el nódulo y a nivel de planta entera.

2) Analizar la regulación del enzima OASTL, responsable de la síntesis de cisteína, en plantas de guisante noduladas en condiciones de estrés hídrico o de deficiencia de azufre, estudiando la actividad, niveles de proteína y expresión génica.

3) Estudiar la asimilación de azufre y las fuentes de azufre utilizadas por *R. leguminosarum* en vida libre y en simbiosis con plantas de guisante, utilizando una cepa bacteriana mutante en el enzima APS reductasa, el único paso de la ruta de asimilación de azufre que está codificado por un solo gen en bacterias.

RESEARCH OBJECTIVES

RESEARCH OBJECTIVES

The main problem of BNF in agriculture is its high sensitivity to environmental constraints; amongst them, S deficiency has not been studied in depth. Furthermore, despite the importance of S metabolism, both in plants and in bacteria, there is scarce information about the regulation of this pathway in nodulated leguminous plants and in rhizobia. Therefore the general objective of this work has been to deep into the relation between sulphur metabolism ant the fixing symbiosis *Pisum sativum* – *Rhizobium leguminosarum*.

The present study has been structured in three chapters; each one develops a specific aim:

1) Characterize the physiological responses of pea plants to sulphur deficiency when it is applied in two stages of nodule development and study its relationship with the changes produced by S deficiency in carbon and nitrogen metabolism, in the nodule and at the whole plant level.

2) Analyze the regulation of the enzyme OASTL which is responsible of the synthesis of cysteine, in nodulated pea plants subjected to drought stress or sulphur deficiency, studying its activity, protein levels and gene expression.

3) Study S assimilation and sulphur sources used by *R. leguminosarum* in free living conditions and in simbiosis with pea plants, using a mutant strain defective in APS reductase, the only enzyme in sulphate assimilation encoded by a single gene in bacteria.

I. MATERIALES Y MÉTODOS

1.1. EL MACROSIMBIONTE: *PISUM SATIVUM* L.

La especie utilizada para la realización de este estudio ha sido *Pisum sativum* L (guisante). El guisante pertenece al orden *Fabales*, familia *Leguminosae*, subfamilia *Papilionoideae*, tribu *vicieae* y género *Pisum* (Sprent, 2001).

El guisante es una planta herbácea anual, de germinación hipógea, y con un sistema radical poco desarrollado, formado por una raíz axonomorfa y muchas raíces laterales finas. La parte aérea de la planta está compuesta por un único tallo laxo y rastrero que no puede mantener la verticalidad sin soporte. La altura máxima que puede alcanzar el tallo es variable, dependiendo de la variedad. Las hojas son alternas y pinnado-compuestas, con foliolos ovalados (de 1 a 4 pares), y acabadas en un zarcillo simple o ramificado que ayuda a la planta a trepar y a sujetarse conforme va creciendo. En la base del peciolo de cada hoja crecen dos estípulas grandes y con forma parecida a las hojas, que rodean al tallo. El fruto del guisante es una legumbre (conjunto de vaina y semillas) que puede adoptar diferentes formas y dimensiones según la variedad, y puede albergar de 4 a 12 semillas (Gálvez, 2004; De Ron, 2001).

El cultivo del guisante ya es mencionado por escritores de la Antigua Grecia y Roma en el año 500 a.C., y se cree que el centro de origen pueda ser Etiopía y Asia central (Vavilov, 1949). Hay evidencias arqueológicas que sugieren que su cultivo se extendió posteriormente hacia Oriente Próximo y la Cuenca Mediterránea, y desde éste área fue introducido en Europa hacia el año 2000 a.C., donde se diversificó rápidamente hasta dar la mayoría de las variedades conocidas en la actualidad (Maxted and Ambrose, 2001). El guisante se ha cultivado durante milenios, sobre todo debido a su contenido relativamente elevado en proteína (Monti, 1983). El guisante proteaginoso presenta un contenido estable en proteínas, alrededor de un 20-25%, y es rico en los aminoácidos esenciales lisina y triptófano, aunque es pobre en aminoácidos azufrados (Ramos, 1988). Además, es rico en vitaminas de los grupos K y B, y en azúcares simples (glucosa, fructosa, sacarosa, sorbitol) y en oligosacáridos de la familia de la rafinosa (http://www.coolseasonfoodlegume.org/P_sativum).

En la actualidad, su cultivo está extendido a nivel mundial, en zonas de clima templado, ya que su rango de temperaturas óptimas de crecimiento está entre los 14 y los 26° C. En la actualidad el guisante se aprovecha como grano seco, para

alimentación animal y forraje, y también como grano fresco, para alimentación humana, existiendo variedades claramente diferenciadas para cada uso. El guisante constituye un componente importante en la dieta humana en las regiones de clima templado de todos los continentes, y, en menor medida, en algunas regiones de clima subtropical (Roy Davies, 1995). En los países desarrollados se comercializa sobre todo como producto congelado.

I.1.1. Variedad Sugar boys (*Pisum sativum* L cv Sugar snap)

Para los capítulos 1 y 2, se emplearon plantas de guisante *Pisum sativum* L cv Sugar snap, que fueron suministradas por Syngenta Seeds SA. El cultivar Sugar Snap es una de las variedades de guisante de legumbre comestible. En las variedades convencionales de guisante verde, la capa interna de la vaina está compuesta por células de esclerénquima, que hace que ésta sea fibrosa e indigesta; en cambio, las vainas de las variedades de legumbre comestible, como Sugar Snap, carecen de esta capa, y por lo tanto las vainas son tiernas y digeribles (Gálvez, 2004).

Las variedades de guisante grano son las más habituales en la dieta humana, aunque las variedades de guisante vaina o tirabeque también tuvieron un papel importante. En la actualidad tanto la producción como el consumo de guisantes de legumbre comestible está repuntando, gracias sobre todo a los cultivares de guisante dulce, como Sugar Snap y otros similares (Thorndyke, 1983). En concreto, el cultivar Sugar Snap presenta un alto contenido en azúcares tanto en las vainas (90 mg g⁻¹ peso fresco) como en los granos (125 mg g⁻¹ peso fresco), siendo la fructosa el azúcar mayoritario en ambos casos (Azpilikueta et al., 2002). Estas características hacen de esta variedad de guisante dulce un producto de alto valor comercial. De hecho, ha sido comercializado con éxito en Estados Unidos como producto fresco (Basterrechea and Hicks, 1991), y se cultiva desde hace algunos años en la zona media del Valle del Ebro para su consumo como producto congelado (Azpilikueta et al., 2002), exportándose toda la producción a otros países europeos.

I.1.2. Variedad Avola

La variedad de guisante empleada en el capítulo 3 fue Avola, otro cultivar de guisante dulce, de crecimiento rápido y germinación y maduración tempranas, usado ampliamente como variedad comercial de legumbre comestible en varios países europeos. La planta de guisante Avola alcanza una altura aproximada de 60 cm, y produce gran abundancia de vainas tiernas y comestibles, con un promedio de 6 guisantes por vaina. (www.tozerseeds.com/eu/es/guisantes; www.thompson-morgan.com/vegetables/vegetable-seeds/pea-and-bean-seeds/pea-avola-kew-collection-seeds/4883TM)

I.2. EL MICROSIMBIONTE: *RHIZOBIUM LEGUMINOSARUM* BIOVAR *VICIAE*

Las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* son móviles gracias a la existencia de 1 a 6 flagelos de inserción no polar, son capaces de crecer en condiciones aeróbicas, y muchas cepas también en ambientes microaeróbicos. Adquieren la capacidad para fijar nitrógeno cuando se asocian en simbiosis con leguminosas de clima templado (Jordan, 1984); sin embargo, cuando estos microorganismos no viven simbióticamente en los nódulos de la raíz de la leguminosa huésped, viven como saprófitos en el suelo, donde compiten con bacterias quimioheterótrofas, siendo su densidad media en el suelo de entre 10^2 y 10^5 células por gramo de suelo (Aparicio-Tejo et al., 1993). Además, estos microorganismos son quimioorganótrofos, por lo que pueden utilizar varios compuestos como fuente de energía. En concreto, los requerimientos de carbono vienen proporcionados por una gran variedad de carbohidratos, particularmente manitol, glucosa, arabinosa, fructosa, galactosa y sacarosa (Vincent et al., 1979), mientras que la fuente de nitrógeno puede ser suministrada por nitrato, amonio y algunos aminoácidos. Su temperatura óptima de crecimiento varía entre los 25 y los 30° C, con un pH óptimo entre 6 y 7. Son bacterias de crecimiento rápido, que producen acidificación del medio de cultivo, y forman colonias circulares semi-translúcidas, convexas y mucilaginosas (Marino, 2006). El aspecto mucilaginoso de las colonias es debido a la presencia de polisacáridos extracelulares.

En simbiosis, ésta bacteria forma nódulos radicales cilíndricos y en menor medida ramificados, de crecimiento indeterminado, que mantienen un meristemo persistente donde nuevas células son continuamente infectadas por la bacteria. Los bacteroides son irregulares y presentan forma de X e Y (Jordan, 1984).

I.2.1. Cepa NLV8

La cepa de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* NLV8 utilizada para los experimentos de los capítulos 1 y 2 fue aislada en un suelo agrícola de Navarra, en el término municipal de Ororbia (Frechilla, 1994). Es una cepa de tipo *hup*⁻, lo cual se confirmó mediante un análisis Southern-blot de DNA digerido con EcoR1 usando una sonda específica para *hup* preparada mediante marcaje con dioxigenina del cósmido pAL618 que contenía el cluster completo de genes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* cepa UPM791 (Matamoros et al., 1999). Así, esta cepa carece de la capacidad de reciclar total o parcialmente el hidrógeno que se genera durante la reacción de la nitrogenasa (Phelps and Wilson, 1941), siendo de gran utilidad para la medida de la tasa de fijación de nitrógeno por el método de la ANA, mediante el cual se mide la actividad aparente de la nitrogenasa de forma indirecta, por la cantidad de hidrógeno producido en la reacción.

I.2.2. Cepa 3841

Es una cepa resistente al antibiótico estreptomicina derivada de forma espontánea de la cepa salvaje 300, caracterizada y aislada a partir de suelos agrícolas, por Johnston y Beringer (1975). El genoma de la cepa 3841 se compone de un cromosoma circular, el cual alberga el 65% de los genes, y seis plásmidos grandes, de los cuales el plásmido pRL10 es el plásmido Sym, y es transferible por conjugación (White, 2006).

I.2.3. Cepa RU1722 (doble mutante *aap/bra*)

Las cepas mutantes *aap/bra* presentan mutaciones en genes que codifican para las distintas subunidades de dos transportadores de tipo ABC (ATP Binding Cassette, casete de unión a ATP) de la membrana bacteroidal de *Rhizobium leguminosarum*:

AapJQMP y BraDEFGC (Walshaw and Poole, 1996; Hosie et al. 2002). La cepa utilizada en este estudio, RU1722, es un doble mutante *aapJQM/braEF* generado por transducción (Lodwig et al., 2003).

I.3. MANTENIMIENTO Y CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS BACTERIANOS

I.3.1. Medios de cultivo para la cepa NLV8

El mantenimiento de la cepa NLV8 de *Rhizobium* se realizó sembrando esta cepa en estrías, por agotamiento, en placas de Petri con medio YEMA (Yeast Extract Mannitol Agar) (Vincent, 1970). La composición de este medio, para 1 lt de agua bidestilada es la siguiente:

Medio YEMA pH=6.8	
Extracto de levadura	0.4 g
Manitol	10 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g
K ₂ HPO ₄	0.5
NaCl	0.1
Agar (medio sólido)	15 g

Tras una incubación del cultivo durante 72 horas a 26° C, esta cepa se mantuvo a 4° C, y cada 3 meses se hizo una resiembra o “refresco” del cultivo en otra placa, para asegurar la viabilidad celular y el mantenimiento correcto de la cepa.

Para inocular las plantas, se seleccionó una colonia aislada de bacterias de la placa de mantenimiento de las cepas y se resuspendió en un erlenmeyer de 250 ml que contenía 50 ml de medio líquido YEM. El medio YEM tiene la misma composición y pH que el YEMA, pero no contiene agar, por lo que es líquido. El cultivo se creció en un agitador orbital (Sanyo Gallenkamp, Loughborough, UK) durante 72 horas a 26° C y 170 rpm. Después de 72 horas, la suspensión bacteriana ha alcanzado una DO₆₈₀ de 0.7, aproximadamente, lo cual equivale a una concentración de 3.3×10^8 células. En ese punto, se puede considerar que el cultivo bacteriano está en su fase exponencial de crecimiento, y por lo tanto es el momento óptimo para inocularlo en plantas (Vincent, 1970).

Todos los medios empleados se esterilizaron en autoclave durante 30 minutos a 121° C a 1 atmósfera de sobrepresión. La manipulación de los microorganismos se realizó en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar Telstar modelo Micro-H (Telstar Industrial S.L., Terrasa, España).

I.3.2. Medios de cultivo y antibióticos para cepa 3841 y derivadas

La cepa parental 3841 y las cepas mutantes LMB627 (mutante *cysH*) y RU1722 (mutante *aap/bra*) construidas a partir de dicha cepa fueron crecidas en placas de agar o en medio líquido a 26° C. Los medios de cultivo utilizados fueron el medio completo TY (Tryptone Yeast), en agar o líquido (Beringer, 1974) o medio mínimo AMA/AMS (Acid Minimal Salts, agar/líquido; tabla) (Beringer, 1974; Poole et al., 1994). Después de autoclavar el medio, se añadió 1 ml de solución C estéril para *Rhizobium*, que contiene vitaminas (3 mM tiamina HCl, 4.2 mM ácido D-pantoténico (sal de Ca) y 4.1 mM biotina), además de glucosa o piruvato (10 mM) y NH₄Cl (10 mM) como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, y antibióticos, cuando fue necesario.

Para estudiar el crecimiento de las cepas de *R. leguminosarum* en diferentes fuentes de azufre y analizar su auxotrofia para dichos compuestos azufrados, se utilizó una solución líquida libre de azufre, modificada a partir del medio AMS (Acid Minimal Salts), en el cual el MOPS ha sido sustituido por sales de potasio, y las sales de sulfato, sustituidas por concentraciones equimolares de cloruros. La composición se detalla en la tabla 4. Tras autoclavar el medio, se añadió solución C, glucosa y NH₄Cl a la misma concentración que para el medio AMA/S. El agar comercial contiene fuentes de azufre complejas, por lo que sólo se utilizó esta solución en forma líquida. Asimismo, todos los antibióticos comerciales están formulados químicamente en forma de sulfatos, por lo que para el crecimiento de las cepas en este medio no se añadió ningún antibiótico. El azufre está presente también en las vitaminas biotina y tiamina, añadidas al medio en la solución C, pero sus concentraciones en la solución final son del rango micromolar (µM), por lo que no se consideraron como fuentes de azufre para la nutrición de las bacterias.

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas para la mutagénesis se crecieron a 37° C en medio completo LB (Luria-Bertani) agar o líquido (Miller, 1972). La composición

de los cuatro medios, para 1 lt de agua bi-destilada, así como los antibióticos e indicador utilizados en cada caso se detallan en las tablas I.1 y I.2:

Tabla I.1: Medios de cultivo para el crecimiento de las cepas de *R. leguminosarum* derivadas de la cepa 3841 y para *E. coli*.

Medio TY pH=7		Medio LB pH=7	
Tryptona	5.0 g	Tryptona	10.0 g
Extracto de levadura	3.0 g	Extracto de levadura	5.0 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.9 g	NaCl	5.0 g
Agar (medio sólido)	15 g	Agar (medio sólido)	15 g

Medio AMA/S pH=7			
		Micronutrientes	
K ₂ HPO ₄	0.5 mM	Na ₂ EDTA	4 μM
MgSO ₄ · 6H ₂ O	1 mM	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.56 μM
NaCl	3.46 mM	NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.83 μM
Tampón MOPS	20 mM	H ₃ BO ₃	4 μM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.17 mM	MnSO ₄ · 4H ₂ O	2.3 μM
FeSO ₄ · 7H ₂ O	24.2 μM	CuSO ₄ · 5H ₂ O	80 nM
		CoCl ₂ · 6H ₂ O	4.2 nM

Medio AMA libre de azufre pH=7			
		Micronutrientes	
K ₂ HPO ₄	0.5 mM	Na ₂ EDTA	4 μM
KH ₂ PO ₄	2.64 mM	ZnCl ₂	0.56 μM
NaCl	3.46 mM	NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.83 μM
MgCl ₂ · 6H ₂ O	2 mM	H ₃ BO ₃	4 μM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.17 mM	MnCl ₂ · 4H ₂ O	2.3 μM
FeCl ₂ · 4H ₂ O	24.2 μM	CuCl ₂ · 2H ₂ O	80 nM
		CoCl ₂ · 6H ₂ O	4.2 nM

Tabla I.2: lista de antibióticos e indicador utilizados, con las concentraciones utilizadas para cada especie

Antibióticos/indicador	Concentración ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	
	<i>E coli</i>	<i>R. leguminosarum</i>
Kanamicina	20	-
Estreptomicina	-	500
Neomicina	200	80 (AMS/A); 250(TY)
Espectinomicina	-	100
tetraciclina	10	2(AMS/A); 5(TY)
X-gal	40	-

I.4. CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS

I.4.1. Germinación

Las semillas de *Pisum sativum* L cv Sugar Snap se esterilizaron según el método de Labhili et al. (1995), descrito para semillas de trigo. Las semillas se sumergieron durante 40 minutos en una solución de hipoclorito sódico (NaClO) al 1% (v/v) y SDS al 0.01% (p/v). Tras varios lavados con abundante agua desionizada para eliminar los restos de la solución anterior, se mantuvieron durante 10 minutos en una solución de HCl 0.01 N, y después se lavaron nuevamente con agua desionizada. Para su germinación, las semillas se extendieron en bandejas con una mezcla de perlita:vermiculita 1:1, previamente hidratada con agua desionizada. Las bandejas se mantuvieron en oscuridad en una cámara a 26°C durante tres días. Transcurrido este tiempo, se pasaron las bandejas con las semillas germinadas a la cámara de crecimiento en la que crecerán, se humedeció el sustrato con agua destilada, y se inocularon las semillas con la cepa NLV8 de *Rhizobium leguminosarum*, rociándolas con 50 ml de cultivo bacteriano en medio YEM en su fase exponencial, tal y como se ha explicado en el anterior apartado. A los 3 días, se reinocularon de nuevo con el mismo volumen de suspensión bacteriana.

I.4.2. Imposición de la deficiencia de azufre

I.4.1.1. Hidropónico puro

A los 10 días de su esterilización, y 7 días después de la primera inoculación y de su germinación, las plántulas fueron transferidas a macetas individuales de 1L con solución hidropónica aireada, en una cámara de crecimiento de ambiente controlado con las siguientes condiciones: 14 horas de fotoperíodo, radiación fotosintética de $525 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura $22/16^\circ \text{C}$ (día/noche), y 60/70% humedad relativa (día/noche). La composición de la solución nutritiva libre de nitrógeno utilizada (Kalia and Drevon, 1985) fue la siguiente:

Tabla I.3: solución nutritiva Kalia and Drevon control

Macronutrientes		Micronutrientes	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.3 mM	H_3BO_3	4 μM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 mM	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.9 μM
K_2SO_4	1.25 mM	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 μM
KH_2PO_4	0.25 mM	$\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.1 μM
		$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6 μM
		Fe (Sequestrene)	16.6 mg l^{-1}

Tabla I.4: solución nutritiva Kalia and Drevon modificada sin azufre

Macronutrientes		Micronutrientes	
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.3 mM	H_3BO_3	4 μM
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 mM	ZnCl_2	0.9 μM
$\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$	0.25 mM	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 μM
CaCO_3	2 mM	$\text{NaMoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.1 μM
KCl	2 mM	$\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	6 μM
		Fe (Sequestrene)	16.6 mg l^{-1}

El pH fue ajustado a 6.5 antes de transferir las plantas a la solución. Este pH se mantuvo constante añadiendo $0.2 \text{ g l}^{-1} \text{CaCO}_3$ a la solución nutritiva cada vez que se reemplazaba la solución.

En el momento del trasplante, se seleccionaron las plántulas cuya radícula había alcanzado una longitud aproximada de unos 10 mm y se separaron aleatoriamente en tres grupos: un grupo de plántulas fue transferido a solución hidropónica Kalia-Drevon modificada libre de azufre el día del trasplante (plantas “-S 28D”, ó “-S 28 días”); otro grupo fue transferido a esa misma solución sin azufre 7 días después del trasplante

(plantas “-S 21D” ó “-S 21 días”). Finalmente, el grupo de plantas control (C) se mantuvo en la solución nutritiva Kalia-Drevon normal durante todo el experimento (figura I.1).

La solución hidropónica se reemplazó completamente una vez por semana, para todos los tratamientos. Para la solución libre de S, se reemplazó el MgSO_4 y el K_2SO_4 por MgCl_2 y KCl respectivamente, en la misma concentración molar. El pH fue igualmente ajustado a 6.5 antes de transferir las plantas a la solución.

Las determinaciones fisiológicas y el muestreo de las plantas se llevaron a cabo a las 4 semanas del trasplante a solución hidropónica. En ese momento, las plantas del grupo “-S 28D” habían estado 4 semanas (28 días) en deficiencia de azufre, y las plantas del grupo “-S 21D”, 3 semanas (21 días).

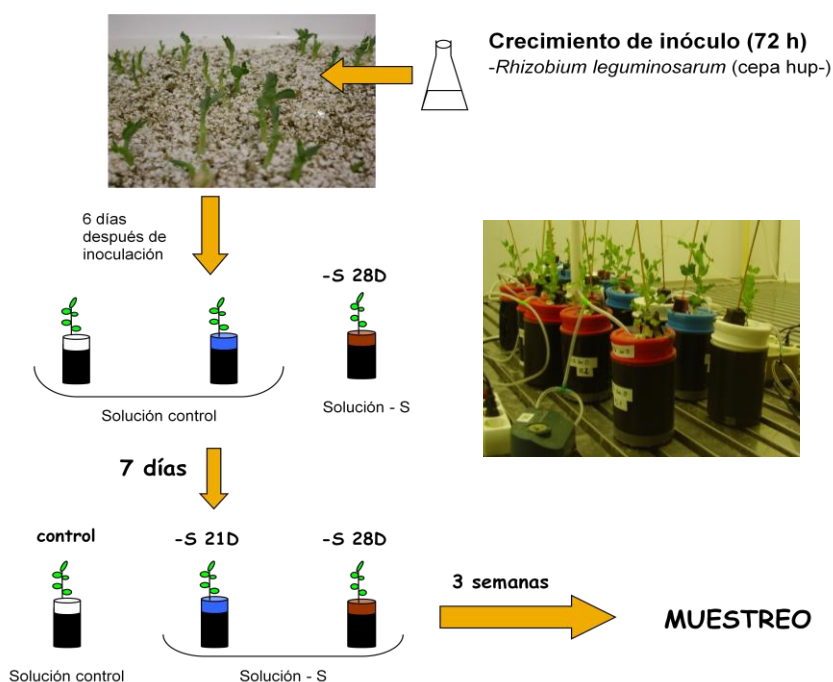


Figura I.1: esquema de las condiciones de crecimiento de las plantas: germinación, inoculación y tratamientos de deficiencia de azufre.

I.4.1.2. Hidropónico con sustrato

En el capítulo 2, se cultivaron las plantas de guisante en cultivo hidropónico con sustrato. En este caso, las plántulas de guisante fueron trasplantadas a maceta a los 7 días de la siembra, y 3 días después de su primera inoculación. Las plantas crecieron durante 4 semanas en *tuppers* alimentarios con tapa de rosca de 600 ml de capacidad, adaptado a maceta. Para adaptar el *tupper* a maceta, se practicaron 3 orificios en la tapa, uno para permitir la salida del tallo, y los otros dos para riego y aireación; además, se practicaron otros dos orificios para drenaje en la base del *tupper*.

En el momento del trasplante se realizó una segunda inoculación con 1 ml de cultivo celular de *Rhizobium leguminosarum*. El sustrato utilizado en las macetas, fue el mismo que el que se usó para la germinación de las semillas, una mezcla hidratada de perlita:vermiculita 1:1. Las plantas se regaron dos veces por semana hasta capacidad de campo con la misma solución Kalia-Drevon que la utilizada para el capítulo 1, y se les impusieron los mismos tratamientos de deficiencia de azufre. Un grupo de plantas fue regada desde el principio (desde el día del trasplante) con solución Kalia-Drevon sin azufre (plantas “-S 28D”), y otro grupo de plantas se regó con solución Kalia-Drevon normal la primera semana (es decir, las dos primeras veces que se regaron), y el tercer riego y los siguientes se realizaron con Kalia-Drevon sin azufre (plantas “-S 21D”). El grupo de plantas control (C) se regó con solución Kalia-Drevon normal desde el día del trasplante.

I.4.2. Imposición de los tratamientos de sequía

Para el experimento de sequía (capítulo 2), las plántulas de guisante fueron trasplantadas a maceta a los 7 días de la siembra, y 3 días después de su primera inoculación. Las plantas crecieron durante 4 semanas en *tuppers* alimentarios con tapa de rosca de 600 ml de capacidad, adaptado a maceta con una mezcla hidratada de perlita:vermiculita 1:1, y se regaron tres veces por semana con una solución nutritiva libre de nitrógeno (Rigaud y Puppo, 1975), con la siguiente composición:

Macronutrientes (g/L)		Micronutrientes (mg/L)	
K ₂ HPO ₄	0.2	H ₃ BO ₃	1
CaSO ₄ · 2H ₂ O	0.12	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	MnSO ₄ · H ₂ O	0.08
KCl	0.2	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.03
Na ₂ Fe-EDTA	0.025	NaMoO ₄ · H ₂ O	4
		AlCl ₃ · 6H ₂ O	0.05
		NiCl ₂	0.03
		FeCl ₃ · 2H ₂ O	1
		KI	0.01

A las 4 semanas de crecimiento, las plantas se separaron aleatoriamente en 3 grupos: plantas control, plantas sometidas a sequía moderada, y sequía severa. Las plantas control se regaron diariamente con la solución nutritiva hasta capacidad de campo, mientras que la sequía se impuso en los otros dos grupos mediante la supresión total del riego. La vermiculita es una arcilla inerte que presenta gran capacidad de retención de agua, y por ello permite imponer una sequía de forma gradual. Las plantas sometidas a sequía moderada y sequía severa se cosecharon cuando el potencial hídrico foliar (ver apartado I.5.1.) alcanzó valores de -0.74 ± 0.03 MPa y de -1.3 ± 0.06 MPa, respectivamente, lo cual coincidió aproximadamente con los días 4 y 9 desde el inicio de la supresión de riego. Las plantas control, con un potencial hídrico foliar de -0.37 ± 0.03 MPa, se cosecharon a la mitad del experimento, entre los dos muestreos correspondientes a los tratamientos de sequía.

I.5. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

I.5.1. Potencial hídrico

El potencial hídrico foliar (Ψ_w foliar) se determinó a las dos horas de comenzar el fotoperiodo en la hoja más joven completamente expandida mediante una cámara de presión (Scholander et al., 1965) de Soil Moisture Equipment (Santa Barbara, CA, EEUU). La hoja se coloca con el peciolo hacia arriba en el interior de la cámara a través de un orificio, y se suministra presión al interior de la cámara hasta que aparezca una gota de agua por el centro del peciolo de la hoja. La cantidad de presión que se necesita para que salga la gota de agua indica cual es la tensión, o potencial hídrico del agua de la hoja, y sirve como medida de la intensidad de la sequía. La presión del

interior de la cámara se mide en un manómetro y se provoca inyectando aire (generalmente nitrógeno gas) desde una bala que contiene este gas a presión.

I.5.2. Fotosíntesis

La fotosíntesis se determinó en la última hoja más joven totalmente expandida, mediante el equipo ADC LC Pro+ (ADC BioScientific Ltd., Herts, United Kingdom). La medida se realizó introduciendo uno de los foliolos de la hoja en la cámara del sistema. El equipo constituye un sistema abierto, ya que toma el aire del exterior a través de un tubo conectado a la cámara de medición. Consta de dos analizadores IRGA (analizadores de gases por infrarrojos) que miden la concentración de CO₂ en el flujo de aire antes y después de pasar por la cámara que contiene el tejido vegetal. El valor de fotosíntesis se tomó a los 2 minutos de colocar el foliolo en la cámara, tiempo en el que se estabiliza el flujo de aire en la cámara.

El valor de fotosíntesis se normalizó según el área foliar del foliolo medido, la cual fue determinada mediante un medidor de áreas LI-COR LI-3000 (Li-Cor Inc., Lincoln, NE, EEUU). Los valores de fotosíntesis se expresan en $\mu\text{moles CO}_2 \text{ s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$.

I.5.3. Contenido total de clorofila: SPAD

El contenido de clorofila se estimó utilizando un Chlorophyll meter SPAD-502 (Minolta Camera Co., Ramsey, NJ, EEUU). El equipo calcula el contenido en clorofila en base a la cantidad de luz transmitida por la hoja en dos regiones del espectro, en las cuales la absorción por parte de las clorofilas es muy diferente. Para ello, el medidor utiliza dos LEDs, uno rojo, con un pico de emisión a una longitud de onda de 650 nm y otro infrarrojo, cuya máxima emisión se sitúa a 940 nm, para obtener una absorbancia absoluta ($\text{Abs}_{540} \approx 0$). La cantidad de luz transmitida por la hoja es recogida por un sensor compuesto por un fotodiodo de silicio, se convierte a una señal eléctrica analógica y se procesa para dar una señal digital y ser convertida a unidades SPAD (unidades arbitrarias), que representan el contenido en clorofila total (a y b) presente en la hoja. Se realizaron entre 5 y 6 medidas por planta para el posterior cálculo de una media representativa.

I.5.4. Fijación de nitrógeno (Actividad Aparente de la Nitrogenasa)

La tasa de fijación de nitrógeno fue determinada *in situ* en la planta entera mediante el ensayo de la Actividad Aparente de la Nitrogenasa, según Witty y Minchin (1998). Esta técnica se basa en la medida de la producción del H_2 que se produce en la reacción de fijación, catalizada por la nitrogenasa en los bacteroides del interior del nódulo de plantas fijadoras (ver Introducción, apartado C.1).

Las cepas de rizobios *hup⁻*, como la utilizada en este estudio, carecen del enzima hidrogenasa que se encarga de reoxidar el hidrógeno producido en la reacción. Por lo tanto, en un sistema cerrado (sin pérdidas de gases al exterior), la medida del hidrógeno producido en los nódulos se toma como estimación o medida indirecta de la cantidad de nitrógeno que es reducido (fijado) a amonio.

Para la medida, se traspasó la planta a un bote hermético sin solución nutritiva y se selló el orificio del tallo alrededor del mismo, y otros orificios del bote con masilla aislante. Se practicaron dos pequeños orificios en la tapa del bote, y se conectó un tubo a cada orificio, mediante puntas de pipeta; por un tubo se produce la entrada del nitrógeno procedente de la bala, y por el otro sale el hidrógeno producido en la fijación, hacia el electrodo de medida. En el caso de plantas crecidas en hidropónico con sustrato, la medida se realizó en la misma maceta donde crecieron las plantas, practicando dos pequeños orificios en la tapa para la entrada y salida de gases.

El sistema de medición de H_2 para determinar la actividad nitrogenasa consiste en una bala de gas puro con una proporción de gases conocida y equivalente a la existente en la atmósfera (79% N_2 : 21% O_2), que suministra N_2 a la maceta sellada, mediante el tubo de entrada. El tubo de salida, por el que sale el hidrógeno producido, desemboca en un recipiente sellado y refrigerado para recoger el agua procedente de la solución hidropónica o el sustrato de la maceta. A continuación, para eliminar totalmente los restos de humedad que puedan estropear el electrodo de medida de hidrógeno, el aire pasa por un recipiente sellado que contiene permanganato sódico y lana de vidrio, que actúan como desecante. Finalmente, se mide la concentración de H_2 en el aire que sale del desecante. Para determinar la concentración de H_2 se empleó un detector amperométrico (Qubit Systems, Ontario, Canadá) compuesto por un semiconductor incluido en el interior de un tubo cerámico caliente. Cuando el H_2 se

pone en contacto con el semiconductor se produce la combustión del gas, provocando cambios en la resistencia del semiconductor que dependen de la concentración de H_2 y O_2 , y da una señal de voltaje como resultado. Para linealizar la respuesta del sensor y cuantificar esa señal de voltaje, se utilizó el software Logger Pro, el cual transforma directamente la señal de potencial eléctrico del electrodo en concentración de H_2 , según la recta de calibrado realizada para cada bala de gas puro. Con el fin de verificar que no existen fugas de aire en el sistema de medición, y que todo el hidrógeno producido en el nódulo llega hasta el electrodo de hidrógeno y es cuantificado, se midió el flujo de aire del sistema en cada medida, tomando como válidos únicamente los valores de flujo comprendidos entre 10 y 6.66 ml s^{-1} . Para medir el flujo, se cronometra el tiempo que tarda una burbuja de jabón en recorrer 50 ml en una probeta conectada al sistema.

La medida de producción de H_2 en esa atmósfera estándar indica la actividad aparente de la nitrogenasa (ANA). Este valor es una medida de la proporción de la actividad enzimática que está siendo utilizada para reducir protones, que debe ser al menos el 25% del total de la actividad enzimática, puesto que de los 8 electrones utilizados para la reacción de la nitrogenasa, un mínimo de dos de ellos son empleados en la producción de hidrógeno, y el resto se utilizan para la reducción de nitrógeno a amonio.

Para calibrar el electrodo y determinar a qué concentración de H_2 corresponde la señal de voltaje dada por el electrodo, se empleó la bala de gas puro utilizada para las mediciones (79% N_2 :21% O_2 con $600 \mu\text{moles mol}^{-1}$ de CO_2 , y purificada para eliminar posibles trazas de H_2) y otra bala del mismo gas que contenía $100 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de H_2 ; ambas balas fueron suministradas por Praxair. Se realizaron mezclas con concentraciones conocidas de H_2 mediante un mezclador de gases compuesto por un controlador de flujo de marca ICP modelo FC 31 conectado a dos medidores/controladores de flujo másico marca Bronkhorst Hi-Tech tipo EL (suministrados por Air-Liquide, Madrid, España). El rango de la curva de calibración fue $0\text{-}7.5 \mu\text{moles } H_2 \text{ mol}^{-1}$. Los resultados de ANA se expresaron en $\mu\text{moles } H_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}\text{PF}$ ó PS nódulo.

I.5.5. Parámetros de crecimiento y contenido hídrico

El día del muestreo, se determinaron los pesos frescos (PF ó FW) de parte aérea, raíz y nódulos de plantas de todos los tratamientos en una balanza de precisión. Los pesos secos (PS ó DW) se obtuvieron tras secar el material vegetal en una estufa de secado por circulación de aire caliente a 70° C durante 48 horas.

I.5.6. Análisis de elementos minerales

Para la determinación del contenido de elementos minerales, muestras de hoja, raíz y nódulos desecadas en la estufa y molidas (~0.1 g PS) se digirieron por digestión ácida en un tubo de teflón con una mezcla de 4 ml de ácido nítrico (HNO₃) al 69% y 1 ml peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 33% en un reactor Ultraclave-Microondas Milestone, que calienta las muestras hasta 200° C en 20 minutos, y mantiene esta temperatura durante 2 horas más. Una vez enfriadas las digestiones, los elementos minerales fueron medidos por espectrometría óptica con una fuente de emisión de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES, Iris Intrepid II, Thermo Electron Corporation, Franklin, USA). El ICP-OES permite disociar los átomos o iones que constituyen la muestra, excitándolos a un nivel donde emiten luz de una longitud de onda característica. Un detector mide la intensidad de la luz emitida y calcula la concentración de un elemento en particular, de la muestra. Un plasma es un gas ionizado, eléctricamente neutro y confinado en un tubo de descarga. Los análisis fueron realizados por el Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC (Murcia) http://www.cebas.csic.es/general_spain/ionomica.html. Los resultados se expresaron como mmol g⁻¹ PS (macroelementos) y μ mol g⁻¹ PS (microelementos).

I.6. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

I.6.1. Extracción y determinación de carbohidratos

Para la extracción de azúcares solubles se utilizaron alícuotas congeladas de 0.1 g de parte aérea, raíz y nódulos. Se hicieron 4 lavados con etanol al 80% (3 ml para

raíces y nódulos y 4 ml para hojas), hirviéndolos 3 veces durante 30 segundos en placa calefactora, más 2 lavados a temperatura ambiente.

El volumen total de extracto etanólico, recogido en los 3 hervidos y en los lavados finales se evaporó en un TurboVap®LV Evaporator (Zymark Corp. Hopkinton, MA, EEUU), manteniéndolos durante la noche a 40 °C con aire comprimido a una presión de 1.2 bar, para eliminar completamente la fase hidroalcohólica.

El residuo seco de la evaporación se resuspendió en 4 ml de agua desionizada, se sonicó durante 10 minutos y se centrifugó a 2300 g durante 10 minutos a 4° C. El sobrenadante se recogió y se conservó a -80° C hasta su análisis.

La separación de los distintos azúcares solubles (fructosa, glucosa y sacarosa) en los extractos y la medida de su concentración se realizó mediante electroforesis capilar de alta resolución (HPCE) en un sistema PACE 5500 (Beckman Instruments, Fullerton, CA, EEUU), según el método descrito por Warren y Adams (2000). Para ello, se utilizó un capilar de sílice fundida de 50 µm de diámetro interno y 31.4-31.8 cm de longitud. El tampón utilizado fue benzoato a 10 mM con bromuro de miristil trimetil amonio (MTAB) a 0.5 mM, ajustado a pH 12 con NaOH. La detección se realizó de forma indirecta, con luz UV a una longitud de onda de 225 nm y se trabajó a un voltaje de -15 kV y una intensidad de 20 µA.

El residuo insoluble de la extracción etanólica descrita anteriormente se utilizó para determinar el contenido en almidón según Macrae (1971). Para ello el residuo se pesó y se deshidrató a 70° C en una estufa de aire caliente durante 24 horas, y posteriormente se homogeneizó en un mortero con 4 ml de agua desionizada. Los extractos se incubaron durante 1 h a 100° C y posteriormente se incubaron con 1 ml de tampón acetato (pH 4.5) que contenía 10 U de α -amiloglucosidasa por extracto, a 50° C durante toda la noche en agitación y oscuridad, para permitir la hidrólisis total del almidón a glucosa. Pasado este tiempo, los extractos se centrifugaron a 1000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se recogió y se guardó a -80° C hasta su análisis. El contenido en glucosa se determinó en este extracto por electroforesis capilar, mediante el método descrito anteriormente para la determinación de azúcares solubles. Los resultados están expresados como mg azúcar gr⁻¹ PF.

I.6.2. Extracción y determinación de ácidos orgánicos y sulfato

Alícuotas de hojas, raíces y nódulos almacenadas a -80°C ($\sim 0.1\text{ g}$) se procesaron según Wilson and Harris (1966), con algunas modificaciones. Para ello, se molieron las muestras congeladas con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, y se homogeneizaron con 1.5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% en agua (p/v). El homogeneizado se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 1750 g. La fase acuosa del sobrenadante se lavó tres veces con dietiléter saturado con agua para eliminar el TCA. Posteriormente, la fase acuosa resultante se burbujeó con helio durante 2 minutos para eliminar los restos de dietiléter y después se filtró a través de un filtro de jeringa de $0.45\text{ }\mu\text{m}$.

Los niveles de malato, succinato, citrato y sulfato se determinaron mediante cromatografía iónica en un DX-500 System (Dionex Sunnyvale, CA, EEUU). Para ello se empleó una columna Dionex IonPac AS11 y un método de separación en gradiente (NaOH 2.5 mM/metanol 18% a NaOH 45 mM/metanol 18% en 13 minutos. Los resultados están expresados como mmoles de ácido orgánico/sulfato $\text{g}^{-1}\text{ PF}$.

I.6.3. Extracción y determinación de aminoácidos y aminotioles

Para la extracción de aminoácidos y aminotioles (glutación, homoglutación, γ -glutamil cisteína, cisteínglicina y sus correspondientes formas reducidas) en hojas, raíces y nódulos, alícuotas congeladas almacenadas a -80°C ($\sim 0.15\text{ g}$ en nódulos y ~ 0.2 en raíces y hojas) se molieron en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, y se homogeneizaron por agitación intensa en 1 ml (raíces y hojas) ó 3 ml (nódulos) de HCl 1 M. Las muestras homogeneizadas se mantuvieron en hielo durante 10 minutos, y posteriormente se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 minutos a 4°C . Una vez recogido el sobrenadante, se neutralizó el pH hasta un rango de entre 7-7.5 en todos los extractos de muestra, con NaOH y HCl a diferentes concentraciones, y anotando el volumen utilizado en cada caso. Los extractos neutralizados fueron almacenados a -80°C hasta su uso.

Para la determinación y cuantificación de los diferentes aminoácidos (excepto la cisteína, que fue cuantificada junto con los tioles), se añadieron concentraciones

conocidas de los aminoácidos no proteinogénicos norvalina y homoglutamato, como estándares internos a cada muestra. Posteriormente se derivatizaron con una solución del fluoróforo FITC (isotiocianato de fluoresceína) a 1mM, para detección fluorométrica de los picos de aminoácidos, en tampón borato 20 mM, ajustado a pH 10. La separación y cuantificación de los aminoácidos libres en los extractos se realizó mediante un equipo de electroforesis capilar.

El contenido en aminotioles, (glutación, homoglutación, γ -glutamyl cisteína, cisteínglicina y sus correspondientes formas reducidas) se determinó según el método propuesto por Zinellu et al. (2005). Para ello, se añadió a los extractos concentraciones conocidas de N-Acetilcisteína (NAC) como estándar interno y se derivatizaron con una solución de 5-IAF (iodoacetamidofluoresceína). Con el fin de conocer el contenido total de tioles así como la proporción entre las formas reducidas y oxidadas, una alícuota de cada muestra se redujo con TBP (tributilfosfina). El contenido de tioles de los extractos fue determinado mediante un equipo de electroforesis capilar Beckman Coulter PA-800 (Beckman Coulter Inc., CA, USA) compuesto por un capilar de sílice fundida de 50 μ m de diámetro y de longitud 50/60.2 cm. El tampón utilizado para la separación fue una solución de 20 μ M Na_3PO_4 , 16.5 H_3BO_3 y 100 mM N-metil N-glucamina ajustada a pH 11.2. La electroforesis se realizó a un voltaje de 30kV y 25° C, y la detección de fluorescencia se realizó con un láser a 494 nm de excitación y 518 nm de emisión.

La reducción con TBP reduce las formas oxidadas presentes en la muestra, por lo que el contenido en tioles oxidados para una muestra se calculó como la diferencia entre la concentración en la muestra reducida con TBP (que corresponde a los tioles totales) y la concentración en la correspondiente muestra sin reducir (tioles reducidos). El valor resultante se dividió entre dos, debido a que por cada molécula de tiol oxidado se necesitan dos moléculas de tiol correspondiente reducido. Por la misma razón, los valores de tioles se expresan como nmol de equivalente ácido (o reducido) por peso fresco (nmol eq): un nmol de equivalente ácido equivale a 1 nmol de tiol reducido y a 0.5 nmol de tiol oxidado.

I.7. ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS NÓDULARES

I.7.1. Extracción y determinación de proteína soluble

Nódulos congelados en nitrógeno líquido y almacenados a -80°C (0.1-0.15 g) se homogeneizaron en frío ($0-2^{\circ}\text{C}$) en mortero con 5 ml g^{-1} peso fresco de medio de extracción y PVPP al 20 % (20 mg por 0.1 g de peso fresco de nódulo). La composición del medio de extracción fue la siguiente:

Tampón MOPS pH 7 ...	50 mM
MgCl_2	5 mM
KCl	20 mM
EDTA	1 mM
DTT	10 mM
β -mercaptoetanol	10 mM

El homogeneizado se centrifugó a 4°C a 20000 g durante 30 min, y se retuvieron alícuotas de 100-150 μl de sobrenadante para determinar el contenido en proteína total de la fracción vegetal del nódulo así como para ensayar la actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC). Se desalaron alícuotas de 1-1.2 ml del sobrenadante mediante centrifugación a baja velocidad (180 g, 1 min) a través de columnas de BioGel P6DG (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EEUU) equilibradas con el siguiente tampón:

Tampón MOPS pH 7 ...	50 mM
MgCl_2	5 mM
KCl	20 mM

El extracto desalado se utilizó para el ensayo de las actividades enzimáticas expuestas en el apartado siguiente (ver apartado 1.7.2) y para determinar el contenido en proteína en el extracto desalado. Todas las operaciones se realizaron a 4°C .

La proteína soluble de la fracción vegetal tanto en extractos crudos como desalados se determinó según el método descrito por Bradford (1976). Para ello, se hicieron diluciones 1:50 y 1:100 de los extractos crudos y desalados, y se mezclaron 60 μl de estas diluciones con 200 μl del reactivo de Bradford (BioRad 500 0006 BioRad Laboratories, Hercules, CA, EEUU) previamente diluido (1:5) y filtrado. Se determinó la absorbancia en un espectrofotómetro con lector de microplacas modelo SinergyTM HT (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA) a 595 nm. La concentración de

proteína de las muestras se determinó extrapolándola a partir de una recta patrón de 0 a 6 µg de seroalbúmina bovina (BSA).

I.7.2. Ensayo de actividades: óxido-reducción de NAD(P)H

Las actividades enzimáticas sacarosa sintasa (SS), invertasa alcalina (AI), fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), malato deshidrogenasa (MDH), isocitrato dshidrogenasa dependiente de NADP^+ (ICDH), aspartato aminotransferasa (AAT) y glutamato sintasa (GOGAT), se valoraron por medio de la oxidación o reducción de NAD(P)H/NAD(P)^+ producida en la propia reacción o en una reacción acoplada (en esos casos, se añadieron los enzimas correspondientes a las reacciones acopladas de forma exógena, en el medio de reacción). La valoración en la actividad en reacciones enzimáticas en las que se produce oxidación o reducción de piridín nucleótidos se realiza siguiendo la variación de densidad óptica (DO) a 340 nm debida a la aparición o desaparición de la forma reducida, que presenta un máximo de absorción a dicha longitud de onda, con un coeficiente de extinción molar que es igual para el NADH y el NADPH.

Para el ensayo de todas las actividades enzimáticas, se registró la variación lineal de DO_{340} durante 30 minutos de incubación a 30° C en el lector de microplacas, generándose curvas de actividad con el software Gen 5.1.06 (BioTek Synergy). Las actividades enzimáticas se calcularon a partir del intervalo de máxima pendiente lineal ($R^2 > 0.98$) de la curva registrada por el software para cada enzima durante los 30 minutos de incubación (que representa la actividad máxima). Los valores obtenidos a partir de la pendiente representan el incremento o desaparición de la absorbancia de NAD(P)H por minuto (mAbs/min), y se convirtieron en unidades de actividad enzimática específica teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar del NAD(P)H ($6.22 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y la concentración de proteína. Los resultados se expresaron como $\mu\text{moles NAD(P)H mg}^{-1} \text{ proteína}$. Todos los ensayos y mezclas de reacción fueron optimizados para poder realizarlos en microplacas de 96 pocillos de 250 µl cada uno.

SACAROSA SINTASA (SS) (EC 2.4.1.13): La actividad sacarosa sintasa hidroliza la sacarosa en presencia de uridín difosfato (UDP), produciendo UDP-glucosa, que a su

vez se convierte a glucosa 1-fosfato por medio de la UDP glucosa pirofosforilasa (UDPGPPasa) en presencia de pirofosfato. Posteriormente, la glucosa 1-fosfato pasa a glucosa 6-fosfato mediante la fosfoglucomutasa (PGM), y finalmente se obtiene ácido 6-fosfogluconico, en una reacción catalizada por el enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH), produciéndose NADH, pudiéndose medir el incremento de absorbancia a 340 nm por medio de las reacciones acopladas descritas. La actividad se ensayó en el sentido de la hidrólisis según el método descrito por González et al. (1995), y la reacción se inició por la adición de 10 µl de extracto desalado. El medio de reacción estaba compuesto por:

Tampón Tris pH 7	50 mM
MgCl ₂	5 mM
KCl	20 mM
Sacarosa	100 mM
PP _i (pirofosfato)	1 mM
Glucosa 1,6-bisfosfato ...	20 µM
NAD ⁺	1 mM
UDP	2 mM
UDPGPPasa	0.1 ud/ml
PGM	0.1 ud/ml
G6PDH	0.1 ud/ml

INVERTASA ALCALINA (AI) (EC 3.2.1.26): la invertasa alcalina hidroliza la sacarosa hasta fructosa y glucosa, las cuales se fosforilan por medio de la hexoquinasa (HK) hasta glucosa 6-fosfato y fructosa 6-fosfato. Estos dos azúcares se pueden interconvertir mediante la fosfoglucomutasa (PGM), y la glucosa 6-fosfato se oxida hasta ácido 6-fosfogluconico por medio de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, con reducción de NAD a NADH acoplada, que fue lo que se midió. La actividad se ensayó según el método descrito por González et al. (1995), iniciándose la reacción por adición de 10 µl de extracto desalado. El medio de reacción estaba compuesto por:

Tampón imidazol pH 8 ...	50 mM
MgCl ₂	5 mM
Sacarosa	100 mM
NAD ⁺	1 mM
ATP	1 mM
HK	0.1 ud
PGI	0.12 ud/ml
G6PDH	0.05 ud/ml

FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA (PEPC) (EC 4.1.1.31): este enzima cataliza la transformación de fosfoenolpiruvato a oxalacetato, el cual es reducido a malato por acción de la malato deshidrogenasa (MDH) mediante la oxidación de NADH a NAD. Por tanto, se valoró midiendo la disminución de NADH). No fue necesario añadir MDH, ya que es un enzima muy abundante en nódulos, y por tanto el extracto ya lo contiene. La actividad se determinó según Gonzalez et al. (1995), y la reacción se inició por la adición de 10 µl de extracto crudo. La mezcla de reacción fue:

Tampón MES-Bicina-MOPS pH 8 ...	50 mM
MgCl ₂	5 mM
NADH	0.3 mM
Fosfoenolpiruvato	2 mM
NaHCO ₃	2 mM

MALATO DESHIDROGENASA (MDH) (EC 1.1.1.37): la actividad malato deshidrogenasa transforma el malato en oxalacetato mediante un proceso reversible, con consumo de NADH. Debido a la elevada actividad y contenido de de este enzima en nódulos, los extractos crudos fueron diluidos 40 veces con buffer de extracción para su ensayo. La actividad se determinó de acuerdo con Gordon y Kessler (1990), y la reacción se inició por la adición de 10 µl de 25 mM de ácido oxalacético. La composición del medio de reacción fue:

Tampón MES-Bicina-MOPS pH 8	50 mM
MgCl ₂	5 mM
NADH	0.3 mM

NADP⁺- ISOCITRATO DESHIDROGENASA (ICDH) (EC 1.1.1.42): la ICDH dependiente de NADP⁺ cataliza el paso de isocitrato a 2-oxoglutarato mediante un proceso reversible, con producción de NADPH. Esta actividad se determinó según el método descrito por Ferri et al. (2000), iniciándose la reacción por la adición de 10 µl de extracto desalado. La mezcla de reacción fue la siguiente:

Tampón Bicina- pH 8.5 ..	50 mM
MgCl ₂	5 mM
Isocitrato	1 mM
NADP ⁺	0.5 mM

ASPARTATO AMINOTRANSFERASA (AAT) (EC 2.6.1.1): El enzima cataliza la transaminación reversible de ácido aspártico a glutámico, produciendo oxalacetato, que pasa a malato por medio del enzima MDH, que consume NADH. Se ensayó según González et al. (1995), iniciándose la reacción por la adición de 10 µl de 62.5 mM de α -cetoglutarato. El medio de reacción fue:

Tampón MES-Bicina-MOPS pH 8 ...	50 mM
MgCl ₂	5 mM
NADH	0.3 mM
Ácido aspártico	10 mM
Piridoxal 5'-fosfato (PLP)	3 µM
Extracto desalado	5 µl

GLUTAMATO SINTASA (GOGAT) (EC 1.4.1.14): cataliza la transaminación de glutamina a ácido glutámico, con oxidación de NADH. La actividad se ensayó según Groat and Vance (1981), iniciándose la reacción por la adición de 12.5 µl de 100 mM de L-glutamina. La mezcla de reacción contenía:

Tampón Bicina pH 8.6	50 mM
DTT	10 mM
NADH	0.2 mM
α -cetoglutarato	1 mM
extracto desalado	12.5 µl

I.8. ACTIVIDAD O-ACETILSERIN(TIOL)LIASA

El enzima O-acetilserin(tiol)liasa (OASTL) cataliza la reacción de producción de cisteína por incorporación de sulfuro al esqueleto carbonado de O-acetilserina (OAS):



La medida de esta actividad en muestras de hoja, raíz y nódulos de guisante fue puesta a punto en este trabajo, adaptando el protocolo descrito por Barroso et al. (1995) y tomando como referencia el procedimiento utilizado en Pajuelo et al. (2007). Todas las operaciones se realizaron en frío (0-2° C) Alícuotas de las muestras descritas anteriormente (~0.1 g para hojas y 0.2-0.3 g para raíces) se molieron con nitrógeno líquido en mortero hasta polvo fino, y se homogeneizaron con el tampón de extracción (450 µl), compuesto por:

Tampón fosfato potásico ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$) ...	50 mM
DTT	1 mM
PMSF (inhibidor proteasas)	0.2 mM
EDTA	1 mM
PLP	1 μM

Con el fin de ensayar la actividad tanto en la fracción vegetal del nódulo como en los bacteroides, los nódulos intactos congelados a -80°C ($\sim 0.1 \text{ g}$) se homogeneizaron suavemente en mortero frío con el tampón de extracción (500 μl) para evitar en lo posible la rotura de los bacteroides por acción del nitrógeno líquido y por tanto, la contaminación entre ambas fracciones. Tras centrifugación a 20000 g a 4°C durante 10 min, se ensayó la actividad en el sobrenadante y se descartó el precipitado, para muestras de hojas y raíces. Para las muestras de nódulos, el sobrenadante corresponde al extracto de la fracción vegetal, y en el precipitado están los bacteroides, mezclados con restos celulares de la fracción vegetal. Tras 3 lavados de este precipitado con 1 ml de tampón de extracción (homogeneizado suave por pipeteo y centrifugación de 10 minutos a 4°C y 9000 g), los bacteroides se rompieron por sonicación. Para ello, tras el tercer lavado se añadió 1 ml del tampón de extracción al precipitado con los bacteroides, y por ultrasonidos en un sonicador a una intensidad de 20 μA , en pulsos de 1 seg con 1 seg de reposo, durante 4 min. Los restos celulares fueron desechados tras centrifugación a 20000 g durante 15 min, y se recuperó el sobrenadante, correspondiente al extracto de la fracción bacteroidal.

Para el ensayo, se usó un volumen de extracto crudo de hoja, raíz o nódulos (fracción vegetal y bacteroidal) equivalente a 40-50 μg de proteína, medida con el reactivo de Bradford (BioRad 500 0006 BioRad Laboratories, Hercules, CA, EEUU) en espectrofotómetro a 595 nm. La mezcla de reacción, con un volumen final de 900 μl , se componía de:

Tampón fosfato potásico ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$) ...	33.3 mM
O-Acetilserina (OAS)	13.3 mM
Extracto crudo.....	10-100 μl

La reacción se inició por la adición de 60 μl de Na_2S 0.1 M (6.7 mM en el volumen final) a todos los tubos (3 réplicas por muestra) y se incluyeron dos blancos de reacción, uno sin extracto y otro sin Na_2S . Tras un periodo de incubación de 10

minutos a 30° C, la reacción se detuvo añadiendo 50 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 20% (v/v), y las proteínas precipitadas por acción del TCA se eliminaron mediante centrifugación a temperatura ambiente durante 5 min a máxima velocidad.

La L-cisteína formada en la reacción se cuantificó por determinación colorimétrica tras la reacción con el reactivo de ninhidrina (250 mg ninhidrina disuelta en 10 ml de ácido acético:HCl 3:2, v/v), que da un compuesto coloreado con un máximo de absorbancia a 560 nm (Gaitonde, 1967). Para ello, se mezclaron 0.2 ml de ácido acético glacial y 0.2 ml de reactivo de ninhidrina con 900 µl de las muestras procedentes del paso anterior en tubos de cristal, y se incubaron en un baño de agua hirviendo durante 10 min. Los tubos se enfriaron rápidamente en baño de agua fría, y tras añadir 4.5 ml de etanol al 96% (v/v), se midió la absorbancia, usando como blanco el blanco de reacción sin Na₂S para descartar la presencia de cisteína endógena en los extractos. El coeficiente de extinción molar (ϵ) a 560 nm del compuesto formado con la ninhidrina es de 6.4 mM⁻¹ cm⁻¹. La concentración de cisteína se calculó a partir de la absorbancia usando una recta patrón de concentraciones conocidas de L-cisteína. Una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µmol de L-cisteína por minuto. La actividad específica OASTL se expresó, por tanto, como µmoles de cisteína min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

I.9. INMUNODETECCIÓN DE OASA

I.9.1. Electroforesis y western-Blot

Para la determinación inmunológica de OASA (isoforma citosólica de la proteína OASTL) en muestras de hojas, raíces y fracción vegetal de nódulos de guisante, se empleó el anticuerpo policlonal primario de conejo contra la isoforma OASA1 de *Arabidopsis thaliana*, cortesía de R. Hell (Heidelberg Institute of Plant Sciences, Alemania). Previamente, se verificó que el anticuerpo también tenía alta afinidad por varias isoformas de OASTL de guisante, entre las cuales la OASA1 era la isoforma más abundante y detectable.

Como extractos de proteína, se usaron los extractos obtenidos para el ensayo de la actividad OASTL. Se mezcló un volumen de cada extracto equivalente a 5 µg de

proteína con tampón de carga (tampón Tris-HCl 60 mM a pH 6.8, glicerol al 10% (v/v), SDS al 2% (p/v), β -mercaptoetanol 5% (v/v) y azul de bromofenol), en un volumen final de 20 μ l, y las proteínas se desnaturalizaron incubando la mezcla a 98° C durante 5 min.

Para la separación de las proteínas se realizó una electroforesis desnaturalizante (Laemmli, 1970), empleando geles de poliacrilamida de 1 mm de espesor, utilizando 5% y 12% de poliacrilamida (BioRad) para el gel concentrador y separador, respectivamente, y 25 mM Tris-HCl:0.2 M glicina, SDS 0.1% (p/v) (pH 8.3) como tampón de electroforesis. La electroforesis se llevó a cabo a intensidad constante (20 mA por gel) durante 75 min a temperatura ambiente, en un sistema Mino-PROTEAN III (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU).

La transferencia de proteínas a una membrana de PVDF (Immun-Blot PVDF, BioRad) se llevó a cabo a temperatura ambiente en el sistema semiseco de transferencia Nova-blot 2117 Multiphor semidry system (Amersham Biosciences, GE Healthcare) durante 65 min, a una intensidad de 0.8 mA por cm de gel. La composición del tampón de transferencia fue la siguiente: tampón Tris 2.5 mM a pH 8.0, glicina 19.2 mM, SDS 0.1 % (v/v) y metanol 20% (v/v). Tras la transferencia, la membrana se lavó durante 5 minutos con tampón PBS-Tween (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 10mM, KH_2PO_4 1.76 mM, pH 7.4, con Tween 20 al 0.1% (v/v)). A continuación, se bloqueó durante 2 h con leche desnatada en polvo al 5% (p/v), disuelta en tampón PBS-Tween (solución de bloqueo). Una vez pasado este tiempo, la membrana se lavó tres veces durante 5 minutos con PBS-Tween, y se incubó durante toda la noche (~16 h) a 4° C con el anticuerpo primario anti OASA1 de *A.thaliana* (1:20000, en solución de bloqueo). Tras tres lavados con PBS-Tween, la membrana se incubó durante dos horas a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (1:50000, en solución de bloqueo), conjugado con peroxidasa (A-0545, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU). Tras la incubación, se hicieron tres últimos lavados con PBS-Tween. Todos los pasos anteriores se llevaron a cabo en agitación suave.

I.9.2. Detección de OASA por quimioluminiscencia

Tras la incubación con los anticuerpos, las bandas correspondientes a las distintas isoformas de OASTL se visualizaron por quimioluminiscencia, utilizando el kit ECL Advance™ Western Blotting Detection Kit (Amersham, GE Healthcare), siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras incubación de la membrana con solución de revelado (que incluye una solución de peróxido de hidrógeno que reacciona con el anticuerpo secundario), la visualización de las bandas se llevó a cabo en un sistema de documentación de geles Molecular Imager Gel Doc XR System (BioRad).

El análisis y cuantificación de la abundancia de proteína de la isoforma citosólica OASA en los extractos se llevó a cabo con el software Quantity One 1D Analysis (BioRad), midiendo el área de las bandas correspondientes a OASA en las membranas. Con el fin de ajustar esta área y a la cantidad total de proteína del extracto, se utilizó un gel con las mismas muestras y la misma cantidad de proteína que la membrana, sometido a electroforesis al mismo tiempo que el gel correspondiente a la membrana. Posteriormente, se incubó este gel con el reactivo de Coomassie, que tiñe específicamente las proteínas, y se escaneó en un densitómetro GS-800 (BioRad). El área de las bandas correspondientes a las proteínas se midió igualmente con el programa Quantity One.

I.10. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE OASA

I.10.1. Extracción de RNA

Para la extracción del RNA total, muestras congeladas a -80°C ($\sim 0.1\text{ g}$) de hojas, raíces y nódulos (fracción vegetal) fueron homogeneizadas con nitrógeno líquido. El RNA de las muestras se extrajo con el kit comercial RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), siguiendo el protocolo proporcionado por la casa comercial. Una vez extraídos, los RNA se congelaron a -80°C hasta su uso para la síntesis de cDNA (transcripción reversa). En ese momento, se midió su concentración y pureza mediante un espectrofotómetro NanoDrop ND1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington,

DE, EEUU), a 260/280 nm. La relación entre la absorbancia a 260 y a 280 nm (ratio 260/280) sirve como medida de la pureza e integridad del RNA; por ello, se verificó que el ratio 260/280 estaba en torno a 2 para todas las muestras, lo cual indica buena calidad de RNA, y ausencia de contaminación con DNA.

I.10.2. Síntesis de cDNA (transcripción inversa o RT)

La síntesis de cDNA mediante transcripción reversa se realizó con el kit SuperScript™ First Strand (Invitrogen, Life Technologies™, Carlsbad, CA, EEUU), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. Se emplearon oligo dT como cebadores de la reacción, y 2 µg de RNA (se calculó el volumen correspondiente a 2 µg para cada muestra de RNA, a partir de la concentración medida en el NanoDrop).

I.10.3. Diseño de cebadores para qPCR

Debido a la poca información existente acerca de las isoformas del enzima OASTL en leguminosas, y a que este trabajo es el primero en el que se estudia la expresión del gen que codifica para la isoforma citosólica en guisante, se realizó una búsqueda de secuencias de OASTL o cisteína sintasa de *P. sativum*, utilizando la base de datos http://www.coolseasonfoodlegume.org/P_sativum (Cool Season Food Legume Database, Research Consortium, EEUU). Se seleccionaron secuencias con alta homología a la secuencia de *OASA1* de *A. thaliana*, de las cuales se escogió la que tenía mayor número de pares de bases, una mayor región UTR (untraduced, región que no se traduce a proteína), y un mayor homología con la secuencia de aminoácidos de *OASA1* de *Glycine max* (TrEMBL Homology). El código de la secuencia en la base de datos es: p_sativum_wa_contig 21558 (1479 pb).

La secuencia escogida se tradujo a proteína mediante el software Vector NTI Advance 10 (Invitrogen), escogiéndose la secuencia que mejor alineaba con la secuencia de aminoácidos de *OASA1* de *A. thaliana* (82.45% de homología) de entre las 6 posibles lecturas de la traducción a proteína de la secuencia. Los oligos se diseñaron para la región UTR de la secuencia de *OASA* de *P. sativum*. La región UTR de un gen es la más específica para una especie dada, puesto que no se traduce, y por lo tanto permite diseñar cebadores específicos para esa especie. Como gen de expresión

constitutiva o “housekeeping” para normalizar la expresión del gen *OASA* en la qPCR se usó el gen que codifica para el factor de elongación 1-alpha (al mostrar la homología más elevada con el gen *MtTefa* (TC 106470, TIGR M. truncatula Gene Index, <http://www.tigr.org/tdb/mtgi>), expresado constitutivamente en guisante (Marino et al., 2008). Las secuencias de los cebadores diseñados, sintetizados por Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemania), se detallan en la tabla I.5. Todos los cebadores tenían una T_m de $57 \pm 1^\circ \text{C}$ y un contenido de G y C entre 40 y 30%.

Tabla I.5: lista de cebadores utilizados. ID es el número de identificación de los genes en la base de datos PubMed (National Library of Medicine, United States).

Gen	ID	Secuencia	
O-acetilserin(tiol)liasa (<i>OASA</i>) (este trabajo)	290545	For rev	5'-tgaattattgtctcaggcct-3' 5'-aatgccaaatttattccatc-3'
Factor de elongación 1-alpha (Ling et al., 2005; Marino et al., 2008)	X96555	For rev	5'-caactctacttgatgctcttg-3' 5'-accagtaggagcaaaagttac-3'

I.10.4. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

La RT-qPCR para el análisis de la expresión del gen *OASA1* en guisante se llevó a cabo utilizando el kit iQ SYBR Green Supermix (BioRad), usando un termociclador iQTM5 (BioRad). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μl conteniendo: iQ SYBR Green Supermix 1x, oligonucleótidos directo y reverso para *OASA* y el factor 1-alpha, diseñados en el paso anterior (50 nM cada uno) y cDNA (5 ng μl^{-1}). Se realizaron tres réplicas técnicas por muestra y tres réplicas biológicas para cada tratamiento. El programa de PCR utilizado constaba de una etapa inicial de desnaturalización de 10 min a 95°C , seguida de 40 ciclos sucesivos de desnaturalización (15 s, 95°C) e hibridación y elongación (1 min, 60°C). El termociclador lee la señal de fluorescencia emitida al final del ciclo de elongación. Para confirmar la presencia de un único producto de amplificación, así como la ausencia de dímeros entre los oligonucleótidos, se analizaron las curvas de disociación de cada uno de los amplicones. ($55\text{-}90^\circ \text{C}$, ΔT : $0.3^\circ \text{C s}^{-1}$). El nivel de expresión relativa del gen *OASA* se calculó como el ratio de la expresión del gen normalizado frente al ratio de expresión del gen del factor 1-alpha. El cálculo se realizó según la siguiente fórmula:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-dCt}, \text{ siendo } dCt = Ct_{OASA} - Ct_{1\text{-alpha}}$$

I.11. DETERMINACIÓN DE TIOLES POR HPLC

La medida de L-cisteína y glutatión se realizó mediante derivatización con monobromobimano (mBrB), y posterior separación mediante HPLC (Rausser et al., 1991; Dominguez-Solís et al., 2001). Para ello, el material vegetal (~0.1 g de hojas, raíz y nódulos) se pulverizó con nitrógeno líquido y se homogeneizó con una solución de HCl al 0.1 M con 1mM de EDTA (1 ml por 0.1 g de tejido) y se recogió el sobrenadante tras centrifugación de las muestras (15 min, 21400 g, 4° C). En estos extractos se determinó la fracción de tioles que se encontraban en su forma reducida en la planta, añadiendo 20 µl de mBrB 15 mM a un volumen de 120 µl del extracto, para su derivatización. Tras 15 minutos de incubación en oscuridad, la reacción se paró por adición de 250 µl de ácido metanosulfónico al 70% (v/v).

Para la cuantificación del contenido total de tioles fue necesaria una reducción de las muestras previa a su derivatización, debido a que parte de los tioles de la planta se encuentran en forma oxidada y el mBrB sólo reacciona con grupos tiólicos reducidos. Para ello, se incubaron 120 µl de extracto durante 1 h en solución de reducción (Tampón CHES 110mM con NaBH₄ 20 mM, pH 9.3). Una vez transcurrido este tiempo, las muestras se derivatizaron por incubación con mBrB, como se ha explicado anteriormente. Una vez derivatizados, los compuestos tiólicos se separaron mediante HPLC siguiendo el protocolo previamente descrito (Newton et al., 1981). El proceso se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido LACHrom Elite (VWR International), utilizando una columna de fase reversa RP-C18 (5 µm) (Li Chrospher 100). Se inyectaron 30 µl de muestra derivatizada, fijándose el flujo de elución a través de la columna a 1 ml/min con los tampones A (ácido acético 0.25 % (v/v), pH 3.9) y B (ácido acético 0.25 % (v/v) en metanol, pH 3.9).

Para la detección y cuantificación de los compuestos tiólicos se empleó un detector de fluorescencia Hitachi L-2485 (VWR International), con una longitud de onda de 360 nm para la excitación, y de 425 nm para la emisión.

Los estándares comerciales de L-cisteína, glutatión y γ-EC (Sigma) utilizados como patrones para determinar la concentración de tioles se derivatizaron con mBrB, tal y como se describió anteriormente para las muestras.

I.12. TÉCNICAS DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

I.12.1. Construcción del mutante *cysH* de *R. leguminosarum*

I.12.1.1. Amplificación de un fragmento del gen *cysH*

El gen *cysH* de la cepa 3841 de *R. leguminosarum* tiene un tamaño total de 1359 pb, está catalogado en la base de datos RhizoBase (<http://genome.microbedb.jp/cgi-bin/gbrowse/Leguminosarum/#search> ; código del gen: RL1262), y presenta una alta homología con los genes *cysH* de *E. coli* y de varias especies de la familia *Rhizobiaceae*, como *R. etli* y *Sinorhizobium meliloti*. La amplificación de un fragmento de 370 pares de bases (pb) del gen *cysH* de *R. leguminosarum* (figura I.2) se realizó mediante PCR, a partir del ADN genómico aislado del parental Rlv3841. Los cebadores utilizados para amplificar el fragmento, pr1323 y pr1324 (tabla I.6) se diseñaron con el programa Vector NTI Advance 10 (Invitrogen), en base a la secuencia del gen *cysH* de *R. leguminosarum* recogida en RhizoBase y fueron sintetizados por Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemania). Las secuencias de los cebadores incluían una única diana para los enzimas de restricción XbaI (en pr1323) y HindIII (en pr1324), para permitir la posterior clonación (integración) del fragmento en un plásmido.

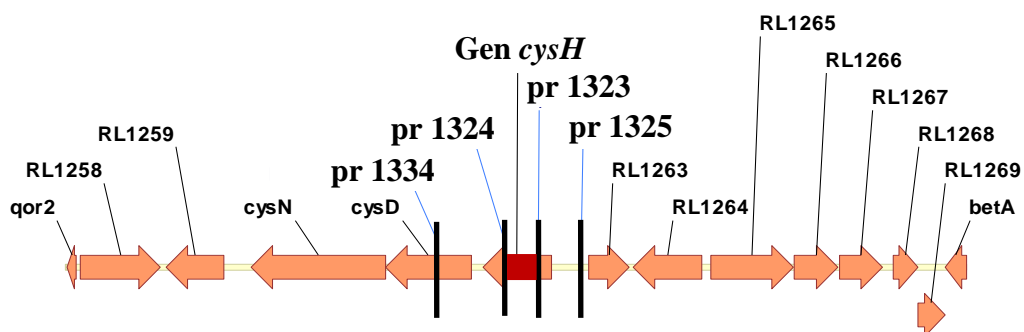


Figura I.2: esquema del gen *cysH* de *R. leguminosarum* con la posición relativa del fragmento amplificado y de los cebadores

En la figura I.2 se muestra la posición relativa de los cebadores utilizados, así como el fragmento a amplificar (en rojo), dentro de la secuencia del gen. Todas las técnicas moleculares y microbiológicas se realizaron en condiciones estériles y

siguiendo los protocolos estándar descritos por Sambrook et al. (2001). La mezcla de reacción para la amplificación por PCR, en un volumen total de 50 μ l se componía de: 10 ng de DNA genómico de la cepa parental, 5 μ l de cada cebador 5 μ M y 25 μ l de *Phusion Master Mix* (Thermo Scientific, Fisher Scientific Ltd., Leics, Reino Unido) que contiene 3 mM de $MgCl_2$, 400 μ M de cada dNTP y 0.04 U/ μ l de polimerasa Taq. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Veriti™ DX (Applied Biosystems), con el siguiente protocolo:

- 1) Desnaturalización: 3 min a 98° C
- 2) Amplificación, durante 30 ciclos:
 - Desnaturalización: 30 s a 98°C
 - Hibridación de los cebadores (annealing): 20 s a 60°C
 - Elongación: 30 s a 72° C
- 3) Elongación final: 5 min a 72° C

Una vez amplificado el fragmento, se comprobó su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.9% (30 min, 140 V) en tampón TAE (40 mM tampón Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8.4). Antes de cargar en el gel, 10 μ l del producto de la PCR se mezclaron en una proporción 5:1 con tampón de carga (30% v/v glicerol y 0.25% p/v azul de bromofenol) y se visualizó la banda correspondiente al fragmento mediante un transiluminador UV, después de teñir el gel con una solución de bromuro de etidio (0.75 μ g ml^{-1}). El producto restante de la PCR se purificó mediante el kit comercial *GeneJet PCR Purification kit* (Fermentas Life Sciences, Thermo Scientific), según su protocolo, almacenándose el DNA purificado a -20° C hasta su uso.

Tabla I.6.: Cebadores utilizados. Tm= melting temperature (temperatura de fusión). Las dianas para enzimas de restricción se muestran en negrita

Nombre	Función	Secuencia (5' - 3')
pr1323	Amplificación (sentido directo) del fragmento de 370 pb del gen <i>cysH</i>	AAATCTAGAGTGGTGTTCACGAC GTCACT
pr1324	Amplificación (reverso) del fragmento de 370 pb del gen <i>cysH</i>	AAAAAGCTTAGCGTCGTATTCGG CAAAAG
pK19A	Mapeo (secuenciación de inserto (directo) en el plásmido pK19mob	ATCAGATCTTGATCCCCCTGC
pK19B	Mapeo (secuenciación de inserto) (reverso) en el plásmido pK19mob	GCACGAGGGAGCTTCCAGGG
pr1325	Mapeo del gen <i>cysH</i> (aguas abajo)	CACAACCAGCATGAACGGAA
pr1334	Mapeo del gen <i>cysH</i> (aguas arriba)	ACGGTACCTATGCCTTGTCAGAT GTCGC
pr1426	Amplificación de la región de 4 kb incluyendo los genes <i>cysH</i> , <i>cysD</i> y <i>cysN</i> (región <i>cysHDN</i>) para complementar el mutante <i>cysH</i>	AAGGTACCAACCCTAAAGCTCAA GC
pr1427	Amplificación de la región <i>cysHDN</i>	AAGGTACCAACCCTAAAGCTCAA GC
pr1375	Mapeo de la región <i>cysHDN</i>	CGAAGGTGAGGTCCATATCA

Tabla I.7: cepas utilizadas en este trabajo

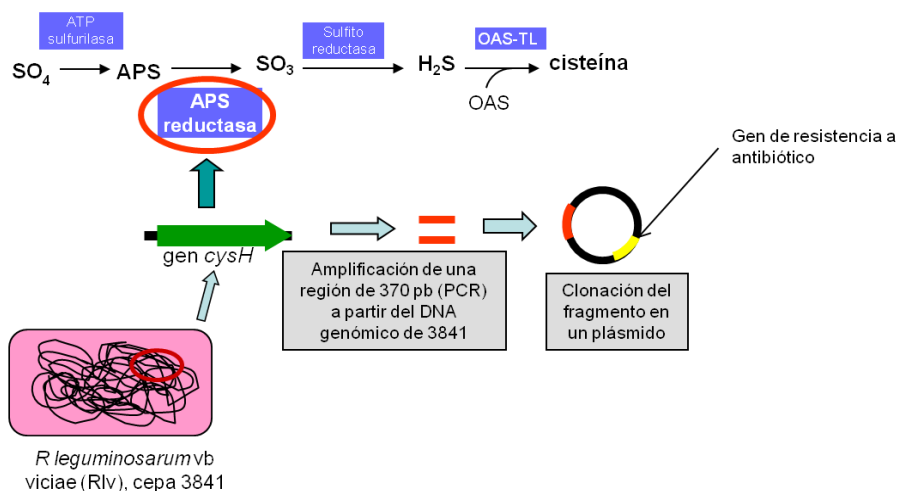
Cepa	Descripción	Origen o referencia
<i>Rhizobium leguminosarum</i>		
3841	Cepa parental Str ^R derivada de la cepa salvaje 300 bv. <i>Viciae</i>	Johnston and Beringer (1975)
LMB627	Mutante <i>cysH</i> , derivado de la cepa 3841 por integración del plásmido pK19mob, Neo ^R	Este trabajo
RU1722	Mutante <i>aapbra</i> , <i>aapJQM::Sp braEF::ΩTc</i>	Lodwig et al. (2003)
LMB625	Mutante <i>cysH</i> transformado con pLMB730, cepa complementada	Este trabajo
LMB626	Mutante <i>cysH</i> transformado con el vector vacío pRK415.1	Este trabajo
<i>E. coli</i>		
DH5α	Cepa de <i>E. coli</i> comercial competente para la incorporación de plásmidos.	Invitrogen
Golden B-21	Cepa de <i>E. coli</i> comercial competente para la incorporación de plásmidos de gran tamaño (>5 kb), lacZ ⁻ .	Clontech Laboratories

I.12.1.2. Ligación entre el plásmido y el fragmento.

El vector de clonación utilizado para integrar el fragmento amplificado fue el plásmido pK19mob (tabla I.8.), (Schafer et al., 1994) con dos genes de resistencia a antibióticos: kanamicina (Kan^R) y neomicina (Neo^R) que permiten la selección de las bacterias transformadas con el plásmido. Este plásmido, además, puede movilizarse entre bacterias por conjugación, y es capaz de integrarse en el genoma de la bacteria hospedadora tras la movilización. El plásmido se aisló de células competentes DH5α de la bacteria *E. coli*, tras crecer las bacterias durante la noche a 37° C en medio LB líquido con kanamicina (composición en tablas I.1 y I.2) y purificar el plásmido a partir del cultivo con el kit *Plasmid DNA Purification Mini kit* (QIAGEN). Tras verificar la pureza del plásmido mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.9% y medir su concentración en el espectrofotómetro NanoDrop (ND-1000 v3.2.1), se sometió a digestión con los enzimas de restricción XbaI y HindIII. El fragmento amplificado en el paso anterior se digirió con los mismos enzimas, y tras purificar los productos de ambas digestiones con el kit *GeneJet PCR Purification kit*, se procedió a la inserción del fragmento en el plásmido con los reactivos incluidos en el kit *CloneJet PCR Cloning kit* (Thermo Scientific). Para la ligación se mezclaron el plásmido pK19mob y el fragmento en una proporción 1:3 junto con 1 µl de ligasa T4 DNA y 1 µl de *ligation buffer* 10X, en un volumen final de 10 µl, y se incubó la mezcla en un baño a 16° C durante toda la noche.

Tabla I.8.: plásmidos utilizados

Plásmido	Descripción	Referencia
pK19mob	Usado para generar mutantes en Rlv3841, derivado del plásmido pUC19; Neo ^R , Km ^R	Schafer et al. (1994)
pRK415.1	Vector de clonación de amplio rango del grupo de plásmidos P; movilizable por conjugación; lacZ ⁺ ; Tc ^R	Keen et al. (1988)
pRK2013	Replicón Col E1 con genes RK2 tra, plásmido helper usado para movilizar plásmidos de los grupos P y Q; Km ^R	Figurski and Helinski (1979)
pLMB630	pK19mob con el fragmento de 370 pb del gen RL1262 (<i>cysH</i>) de Rlv3841; Neo ^R , Km ^R	Este trabajo
pLMB730	pRK415.1 con el fragmento de 4 kb de la cepa Rlv 3841 que contiene el gen <i>cysH</i> ; Neo ^R , Km ^R	Este trabajo

Figura I.3.: amplificación del fragmento del gen *cysH* y clonación en plásmido.

I.12.1.3. Transformación de células competentes de *E. coli*

El producto de la ligación (4 μl) se añadió a 50 μl de un cultivo de células competentes de *E. coli* DH5 α , y se incubó la mezcla en hielo durante al menos 30 min. Posteriormente, se sometieron las células a un choque térmico, incubándolas a 45° C durante 45 s, e inmediatamente se volvieron a incubar en hielo durante al menos 2 min.

Este procedimiento permite la entrada del plásmido a las células, gracias a los poros generados en la membrana de las bacterias por el aumento repentino de temperatura, y sólo es posible en células a las que se ha sometido un tratamiento previo con sales para que sean capaces de captar ADN del medio, llamadas células competentes. Tras la incubación, se añadieron 450 µl de medio líquido SOC estéril (0.5% extracto de levadura, 2% triptona, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucosa, pH 7), y se crecieron las bacterias transformadas a 37° C durante 1 h en un agitador orbital (250 rpm). A continuación, se extendió el cultivo en placas petri con medio LB selectivo (con kanamicina) y se incubaron a 37°C durante toda la noche (18 h).

Se seleccionaron 20 colonias de las placas, y con ellas se llevó a cabo una PCR de colonias para seleccionar aquellas que habían sido transformadas con el plásmido recombinante (con el fragmento). Para ello, se tomó una muestra de cada colonia con una aguja estéril, y se incubaron durante 5 min con 8 µl de la solución comercial GoTaq® Green Taq Mastermix (Promega UK, Southampton, Reino Unido), que contiene Taq polimerasa, MgCl₂ y tampones de reacción a la concentración óptima para una amplificación eficiente de ADN a partir de colonias, así como tampón de carga con tinción para visualizar los productos de la amplificación por luz UV tras la electroforesis. Además, se añadió a la mezcla 1 µl de los oligonucleótidos pK19A y pK19B (directo y reverso, respectivamente; tabla 10), específicos para la amplificación del plásmido pK19mob. Tras la incubación, se llevó a cabo la amplificación por PCR con el siguiente protocolo:

- 1) Desnaturalización: 5 min a 95° C
- 2) Amplificación, durante 40 ciclos:
 - Desnaturalización: 30 s a 95°C
 - Hibridación de los cebadores (annealing): 30 s a 52°C
 - Elongación: 40 s a 72° C
- 3) Elongación final: 5 min a 72° C

Tras la amplificación del ADN de las colonias, se realizó una electroforesis para seleccionar las colonias que contienen el plásmido recombinante. En esas colonias, el tamaño de banda visualizado debe ser en torno a 500 pb, ya que el fragmento amplificado contiene el fragmento de 370 pb más la región del plásmido pK19mob amplificada por sus oligos específicos. De las colonias positivas, se seleccionaron 3,

que se crecieron de nuevo en medio LB sólido con kanamicina, y a partir de este cultivo se realizó un subcultivo en medio LB líquido con kanamicina. El plásmido recombinante se purificó a partir del cultivo líquido de las tres colonias con el mismo protocolo utilizado anteriormente, y tras medir la concentración de ADN en NanoDrop, se seleccionó la colonia en la que se obtuvo la mayor concentración del plásmido. Tras secuenciar el plásmido seleccionado en el servicio de secuenciación del Parque Científico de Norwich (Reino Unido), y comprobar por BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) que la secuencia contenía el fragmento de interés, se mezcló una alícuota del cultivo líquido de la colonia con glicerol (20%) y se almacenó a -80°C con el código pLMB630.

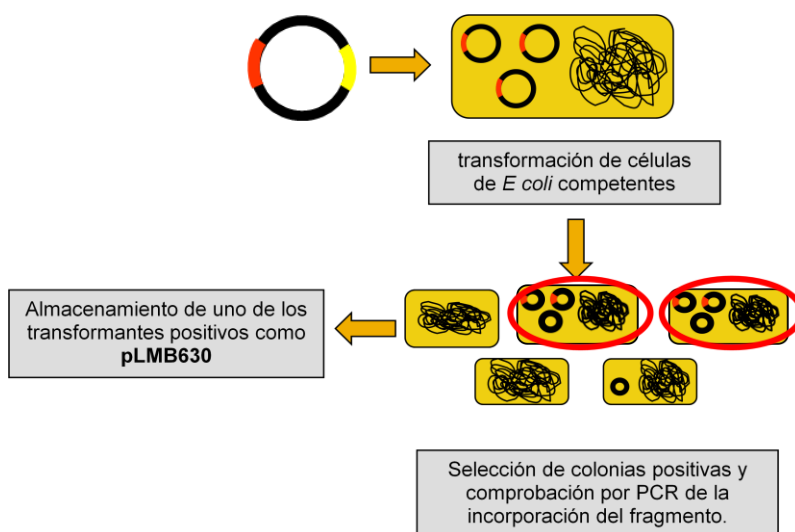


Figura I.4.: transformación de células de *E. coli* con el plásmido recombinante

I.12.1.4. Conjugación de R. leguminosarum

La conjugación es una técnica de transformación bacteriana que permite la transferencia de genes de una bacteria a otra (incluso si son de especies distintas), por un mecanismo que implica contacto célula-célula y la transferencia de un plásmido. Dado que la conjugación es un proceso replicativo (es decir, con síntesis de ADN), al final del proceso tanto la bacteria donadora como la receptora acaban con copias completas del plásmido (Madigan et al., 2003). En este trabajo se utilizó la conjugación

triparental según Poole et al. (1994) para la transferencia de plásmidos de *E. coli* a *Rhizobium* (esquema en figura I.4 sección B). Para ello, se utilizó la cepa *helper* (ayudante o movilizadora) que proporciona el plásmido pRK2013, el cual facilita la movilización y conjugación de un amplio rango de plásmidos entre especies distintas de bacterias (Figurski and Helinski, 1979). El plásmido pRK2013 contiene genes que codifican para factores responsables de la formación de pelos (*pili*) sexuales, que permiten la adhesión y apareamiento entre bacterias, incrementando la frecuencia de conjugación. Además, es un plásmido suicida, es decir, es incapaz de replicarse en la cepa receptora.

La cepa pLMB630 (donadora), con el plásmido recombinante que contiene el fragmento y la cepa *helper* se cultivaron por separado en medio líquido LB con antibióticos durante toda la noche (16 h), a 37° C y 225 rpm de agitación. Posteriormente, 200 µl de cada cepa se subcultivaron por separado en 10 ml de medio LB líquido fresco y se incubaron durante 4 h a 100 rpm y 37° C para promover la formación de pelos sexuales. A las 4 horas, se tomó 1 ml de cada subcultivo, se centrifugó a 6000 rpm durante 5 min, y se lavó tres veces en medio líquido TY, para eliminar los restos de kanamicina del medio de crecimiento y permitir posteriormente el crecimiento de *Rhizobium* (es sensible a kanamicina). Tras el tercer lavado, las bacterias se resuspendieron en medio TY. Por otro lado, un cultivo de la cepa Rlv3841 de *Rhizobium leguminosarum* (receptora), crecido durante tres días en agar TY con estreptomycin a 27° C se resuspendió en 3 ml de medio TY líquido. Se realizó un co-cultivo con las tres cepas, mezclando 400 µl de la cepa receptora Rlv3841, 400 µl de la cepa de *E. coli* donadora y 200 µl de la cepa *helper*. La mezcla se centrifugó para concentrar las bacterias, obteniéndose una suspensión de 30 µl, la cual se añadió en forma de gota a una membrana de nitrocelulosa estéril, colocada en una placa de agar TY. La placa con la membrana de nitrocelulosa se incubó a 27° C toda la noche, y las bacterias crecidas encima de la membrana se resuspendieron en medio TY líquido, y se subcultivaron en placas de agar TY con los antibióticos neomicina y estreptomycin, para permitir la selección de los conjugantes (Neo^R y Str^R) e impedir el crecimiento de *E. coli* y de la cepa parental de *R. leguminosarum* (sensible a neomicina). Tras una incubación a 27° C de entre 5 y 7 días, se realizó un subcultivo mediante siembra por

agotamiento de las colonias obtenidas en una nueva placa de medio TY selectivo. El objetivo es aislar suficientes colonias para tener más posibilidades de encontrar colonias de *R. leguminosarum* en las que el plásmido pLMB630 se haya integrado en el genoma.

I.12.1.5. Mutagénesis de Rlv3841 por inserción del plásmido pLMB630

Una vez seleccionadas las colonias de *Rhizobium* conjugantes (aquellas que han incorporado el plásmido) mediante crecimiento en medio TY con neomicina, se analizaron para saber cuáles de ellas han incorporado el plásmido en su genoma por azar, en la posición correcta (interrumpiendo el gen *cysH*). En estas bacterias ha tenido lugar el fenómeno de recombinación homóloga, por un reconocimiento y entrecruzamiento genético entre el fragmento del gen *cysH* incluido en el plásmido pLMB630 y el gen *cysH* funcional del genoma de la bacteria (ver figura I.5B). En algunos casos esta recombinación da como resultado la integración o inserción del plásmido entero, interrumpiendo el gen, y generando por tanto un mutante por pérdida de función del gen, en este caso el gen *cysH*. Con el fin de escrutar las bacterias que han integrado el plásmido por completo en medio del gen *cysH*, se realizaron dos PCRs de colonias, con un procedimiento similar al explicado en el apartado 5. Los cebadores utilizados fueron los cebadores de secuenciación o mapeo, pr1325 y pr1334 (tabla I.6), diseñados mediante el programa Vector NTI para reconocer dos secuencias del genoma de Rlv 3841 que se sitúan 500 pb antes (aguas arriba) y después (aguas abajo), respectivamente, del fragmento del gen *cysH* clonado en el plásmido. Las posiciones de ambos cebadores dentro se señalan en la figura (gen *cysH*). Asimismo, se utilizaron los cebadores pK19A y pK19B (tabla I.6), para comprobar si el plásmido se ha insertado completamente en el genoma bacteriano.

Se seleccionaron 20 colonias de la placa con medio TY selectivo, y en ellas se amplificó la región comprendida entre los cebadores pK19 del plasmido y pr1325 (figura I.2), con un tamaño de 1.3 kb. Se añadió, además, una muestra de ADN genómico de la cepa Rlv3841, como control negativo. Para la PCR se utilizó la solución *Phusion Master Mix*, y el siguiente protocolo:

- 1) Desnaturalización: 5 min a 95° C
- 2) Amplificación, durante 40 ciclos:
 - Desnaturalización: 30 s a 95°C
 - Hibridación de los cebadores (annealing): 30 s a 60°C
 - Elongación: 45 s a 72° C
- 3) Elongación final: 5 min a 72° C

Las colonias positivas para la inserción del plásmido con el fragmento (aquellas en las que se visualizó una banda de ~1.3 kb en la electroforesis) se utilizaron para realizar una nueva PCR de colonias, esta vez con los plásmidos pK19A y pr1334, con los cuales se amplifica una región de de 1.7 kb (figura I.2). Una de las colonias positivas para esta amplificación se creció durante tres días en medio TY con estreptomycin y neomicina, se resuspendió en medio TY líquido y se almacenó a -80° C en una suspensión de glicerol (20%), etiquetando la cepa como LMB627 (mutante *cysH*).

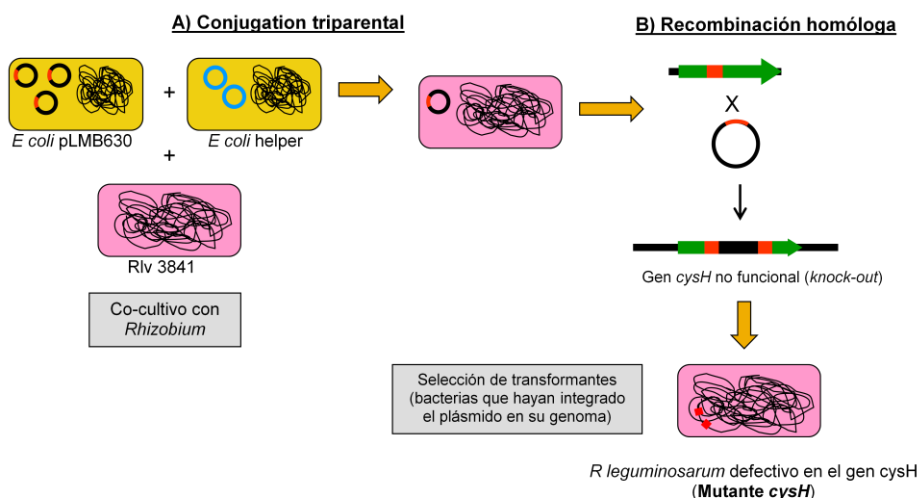


Figura I.5.: Transferencia del plásmido pLMB630 a *R. leguminosarum* por conjugación y obtención del mutante *cysH* por inserción.

I.12.2. Crecimiento de las bacterias en compuestos azufrados

El mutante *cysH* (cepa LMB627) obtenido en este trabajo, junto con su cepa parental Rlv3841 y el doble mutante *aap/bra* (cepa 1722) se crecieron con sulfato, aminoácidos azufrados o glutatión como única fuente de azufre, con el fin de estudiar la capacidad de las cepas para utilizar estos compuestos de forma óptima como fuente

de azufre. Además, se comparó el crecimiento del mutante *cysH* y de la cepa parental en diversos sulfonatos, para saber si *R. leguminosarum* es capaz de usar estos compuestos como fuente de azufre, y si la mutación en el gen *cysH* afecta a esa capacidad.

1.12.2.1. Determinación de las concentraciones de estudio

Previamente al estudio del crecimiento de las bacterias en los compuestos azufrados, se determinaron las concentraciones de cada compuesto a las cuales se obtenía la mínima y la máxima tasa de crecimiento de las bacterias tras 24 h. Para ello, bacterias de un cultivo de la cepa Rlv3841 y de otro de la cepa LMB627 (mutante *cysH*) crecidos durante tres días en agar TY con antibióticos, se resuspendieron en 5 ml de medio mínimo AMA sin azufre esterilizado (composición en tabla), y se centrifugaron durante 10 min a 4000g. El líquido se descartó, y las células precipitadas se resuspendieron de nuevo en medio sin azufre y se centrifugaron, repitiendo la operación dos veces más, para lavar las células y eliminar los restos de medio TY y de antibióticos. Posteriormente, se inocularon 500 µl de cada suspensión bacteriana en erlenmeyers con 50 ml de medio sin azufre, con glucosa, NH₄Cl y vitaminas, suplementado con las siguientes concentraciones de cada compuesto azufrado: 0, 5, 10, 50, 100, 500 µM, 1 y 2 mM. Los compuestos azufrados utilizados para el ensayo, adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis) fueron: Na₂SO₄ (sulfato), cisteína, metionina, glutatión, y sulfonatos (de hexano, metano, etano y taurina). Los erlenmeyers se incubaron a 27° C durante 24 h, y se midió la densidad óptica de los cultivos a 600 nm (DO₆₀₀) en un espectrofotómetro, como medida del crecimiento bacteriano. La máxima DO, y por lo tanto el máximo crecimiento, se alcanza en todos los casos a una concentración de 100 µM, observándose valores similares de DO₆₀₀ para concentraciones mayores. Se estableció, por tanto, 100 µM como la concentración óptima para el estudio del crecimiento de las bacterias en compuestos azufrados, y se tomó también 10 µM, por ser la mínima concentración a la cual se observó crecimiento.

I.12.2.2. Inducción del ayuno de azufre

Primero, las cepas de *R. leguminosarum* se crecieron durante la noche a 27° C en agitación (220 rpm) en medio líquido TY con sus correspondientes antibióticos de selección. Alícuotas de 10 ml de los cultivos se centrifugaron durante 10 min a 4000g, y se lavaron tres veces con medio sin azufre, como se ha explicado en el apartado anterior. Tras el tercer lavado, se midió la DO₆₀₀ de los cultivos, y se inocularon al 1% en erlenmeyers con el mismo medio sin azufre (50 ml), añadiendo glucosa, NH₄Cl y vitaminas, pero sin ninguna fuente de azufre. Los erlenmeyers con las cepas se incubaron durante la noche, para inducir el ayuno de azufre. Esto permitió eliminar todas las fuentes de azufre procedentes del medio TY presentes en el interior de las células, incluyendo los antibióticos utilizados para la selección de cepas, y así asegurarnos de que todo el azufre proviene del compuesto azufrado ensayado en cada caso.

I.12.2.3. Crecimiento en sulfato, aminoácidos azufrados y glutatión

La utilización de estos compuestos como fuentes de azufre se estudió en los mutantes *cysH* y *aap/bra* y en la cepa parental. Para ello, se midió la DO₆₀₀ en cultivos de estas bacterias que habían sido sometidos a ayuno de azufre, y se tomó de ellos el volumen necesario para tener un 1% de inóculo inicial en todos los casos. Las células se precipitaron por centrifugación a 4000 g (10 min), y se resuspendieron en medio sin azufre con glucosa, NH₄Cl y vitaminas, suplementado con 10 o 100 µM de sulfato, cisteína, metionina o glutatión. El crecimiento de las bacterias con estos compuestos se estudió incubando 200 µl del cultivo (4 réplicas por cada cepa, compuesto y concentración) en una microplaca estéril a 27° C y 220 rpm de agitación, registrando la variación de DO₆₀₀ cada 30 min durante 40 h, en un espectrofotómetro con lector de microplacas Gen5 Biotek.

I.12.2.4. Utilización de sulfonatos

La capacidad para utilizar estos compuestos naturalmente presentes en suelos agrícolas se estudió en la cepa parental y en el mutante *cysH*. Para ello, el ayuno de azufre se indujo en cultivos de estas cepas mediante el procedimiento explicado en el

apartado I.12.2.2., y posteriormente se crecieron en medio sin azufre suplementado con 10 o 100 μM de sulfonato de hexano, sulfonato de metano, sulfonato de etano, o sulfonato de 2-aminoetano (taurina), adquiridos en Sigma-Aldrich. La incubación de los cultivos se realizó con el mismo procedimiento que el explicado en el apartado anterior. El crecimiento se midió mediante el registro de la variación de la DO_{600} en el lector de microplacas Gen5 Biotek.

I.12.3. Cálculo del tiempo medio de generación

El número de generaciones (G) es un índice del crecimiento bacteriano usado en microbiología para la comparación de tasas de crecimiento entre diferentes cepas o condiciones, durante la fase logarítmica de crecimiento. Este índice se calculó para todas las cepas crecidas en sulfato, cisteína, metionina, glutatión y sulfonatos, mediante la siguiente ecuación:

$$G = [\log \text{OD}_{600} (t_2) - \log \text{OD}_{600} (t_1)] / \log 2,$$

donde t_1 y t_2 son el tiempo inicial y final, respectivamente, de un rango de la curva de crecimiento en la cual el crecimiento bacteriano es exponencial.

El tiempo medio de generación (MGT) es el tiempo necesario para que una población bacteriana duplique su número. Se calculó igualmente para todas las cepas y compuestos, usando la siguiente ecuación:

$$\text{MGT} = (t_2 - t_1) / G$$

I.12.4. Complementación del mutante *cysH*

I.12.4.1. Amplificación del fragmento *cysHDN*

Con el objetivo de saber si la incapacidad para asimilar sulfato, principal fenotipo del mutante *cysH* (cepa LMB627), puede ser revertido mediante complementación con una copia funcional del gen *cysH*, se amplificó una región de 4224 pb ($\sim 4\text{kb}$), que contiene el gen *cysH*, a partir del ADN genómico de Rlv3841. El fragmento de 4 kb incluye, además del gen *cysH*, los genes *cysD* y *cysN*, que codifican para las dos subunidades del enzima ATP sulphurilasa, por lo que se denominó

“fragmento *cysHDN*”. Los cebadores utilizados para amplificar el fragmento *cysHDN*, pr1426 y pr1427 (tabla I.6) se diseñaron con el programa *Vector NTI Advance 10* (Invitrogen), en base a la secuencia del genoma de Rlv3841 recogida en RhizoBase y fueron sintetizados por Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemania). Las secuencias de ambos cebadores incluían una única diana para el enzima de restricción KpnI. La posición relativa de los cebadores se muestra en la figura I.6:

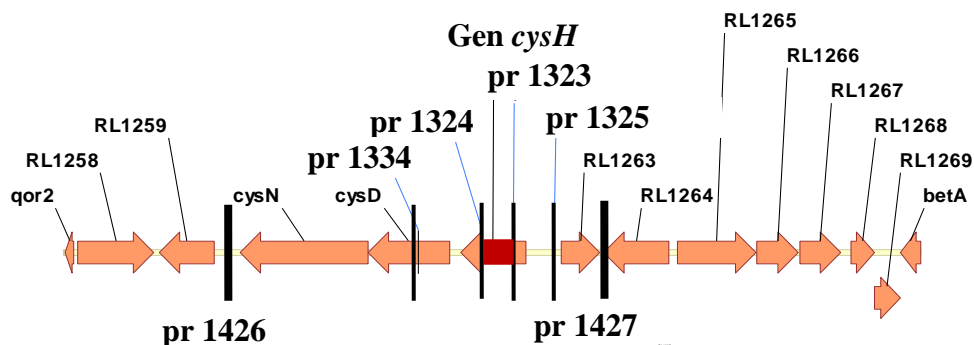


Figura I.6: esquema del fragmento *cysHDN* con la posición relativa de los cebadores utilizados.

La amplificación se realizó siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado I.12.1.1, con el siguiente protocolo:

- 1) Desnaturalización: 3 min a 98° C
- 2) Amplificación, durante 35 ciclos:
 - Desnaturalización: 30 s a 98° C
 - Hibridación de los cebadores (annealing): 30 s a 60° C
 - Elongación: 4 min a 72° C
- 3) Elongación final: 5 min a 72° C

Tras la electroforesis, el producto de la amplificación se purificó a partir de la banda visualizada en el gel de agarosa con el kit *QIAquick Gel Extraction kit* (QIAGEN).

I.12.4.2. Clonación en plásmido y transformación de células competentes

El fragmento purificado se clonó en el plásmido pRK415.1 (Fermentas), que incluye un gen de resistencia a tetraciclina y el gen *lacZ*, con una diana de restricción para el enzima *kpnI* en medio del gen. Para ello, tanto el fragmento *cysHDN* como el plásmido se digirieron con *kpnI*, y posteriormente ambas digestiones se purificaron con el kit *PCR purification kit*. Para la ligación, se mezclaron 5 µl del fragmento con el

plásmido junto con la ligasa T4 DNA, y se dejó la mezcla toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se transformaron células competentes de *E.coli* BL21-Golden, según el protocolo explicado en el apartado I.12.1.3, y se cultivaron en medio LB selectivo con tetraciclina y X-Gal para seleccionar las colonias que hayan integrado el plásmido recombinante. El gen *lacZ* codifica para el enzima β -galactosidasa, que degrada el compuesto X-Gal para dar un compuesto insoluble de color azul. En la ligación, el plásmido se integra en medio del gen *lacZ*, puesto que la integración se produce en la diana de restricción para el enzima *kpnI*, y da lugar a un gen *lacZ* no funcional. Por tanto las colonias que hayan integrado el plásmido no transformado son fácilmente distinguibles por su color azul, puesto que portan un gen *lacZ* funcional y pueden degradar el X-Gal. Las colonias que han sido transformadas con el plásmido recombinante no pueden degradar el X-Gal y mantienen su color blanco natural. Se seleccionaron 60 colonias blancas resistentes a tetraciclina, y en ellas se llevó a cabo una PCR de colonias. Para la amplificación, se usaron los cebadores específicos para el plásmido pRK415.1 y se utilizó el mismo protocolo que para la amplificación del fragmento, cambiando la fase de elongación a 5 minutos. Se realizó una electroforesis del producto de la amplificación, y tras visualizar el gel en un transiluminador, se seleccionaron aquellas colonias para las que se visualizó una banda de amplificación de 5 kb. Las colonias positivas se cultivaron en medio líquido LB con tetraciclina y X-Gal, y se llevó a cabo una purificación del plásmido pRK415.1 recombinante a partir de los cultivos, con el kit *Plasmid Purification kit*. Los plásmidos se digirieron con los enzimas de restricción BamHI, EcoRI y HindIII, y los productos de la digestión se corrieron en gel de agarosa por electroforesis para verificar que contienen el fragmento *cysHDN* (la secuencia del fragmento incluye dianas para estos enzimas). Una de las colonias positivas se almacenó a -80 en glicerol al 20%, y se etiquetó como pLMB730 (pRK*cysHDN*).

I.12.4.3. Conjugación y selección de conjugantes

La transferencia del plásmido recombinante pLMB730 de *E. coli* al mutante *cysH* de *R. leguminosarum* se realizó mediante conjugación biparental, con un protocolo similar al explicado en el apartado I.12.1.4., pero sin usar una cepa *helper*,

puesto que el plásmido pRK415.1 ya contiene los genes necesarios para su movilización y transferencia a otras especies. Paralelamente, el mutante *cysH* también se conjugó con el plásmido pRK415.1 vacío, sin el fragmento *cysHDN*. Tras mezclar las cepas de *E. coli* con el mutante *cysH*, se cultivaron en placas de agar TY con estreptomicina, neomicina y tetraciclina, para seleccionar los conjugantes, y tras 3 días de incubación se seleccionó una colonia positiva de cada conjugación y se almacenaron a -80 en glicerol al 20%. Las nuevas cepas se etiquetaron como LMB625 (mutante *cysH* complementado con el plásmido recombinante pLMB730) y LMB626 (mutante *cysH* con el plásmido pRK415.1 vacío).

I.12.4.4. Ensayo de complementación

Para verificar que el fragmento *cysHDN* complementa la incapacidad para asimilar sulfato en el mutante *cysH*, se estudió el crecimiento en sulfato de la cepa complementada LMB625, junto con la cepa LMB626 (con el plásmido vacío) y el mutante *cysH*, como controles negativos y Rlv3841, como control positivo. Las bacterias se crecieron en agar TY durante tres días con sus correspondientes antibióticos, se resuspendieron en medio sin azufre y se lavaron 2 veces para eliminar los restos de antibióticos y medio TY. Posteriormente, se midió la DO_{600} de las suspensiones bacterianas, y se inocularon al 1% en 10 ml de medio sin azufre, conteniendo glucosa, NH_4Cl y vitaminas, suplementado con 0.1 o 1 mM de Na_2SO_4 como única fuente de azufre. El crecimiento de las cepas en este medio se registró mediante la medida de DO_{600} durante 40 h en un lector de microplacas Gen BioTek 5, con un procedimiento similar al explicado en el apartado I.12.2.3. Si el mutante *cysH* ha sido complementado por la copia funcional del gen *cysH* contenida en el fragmento *cysHDN*, el crecimiento de la cepa complementada LMB625 tras 40 h en Na_2SO_4 será similar al de Rlv3841.

I.13. ESTUDIO DEL FENOTIPO SIMBIÓTICO DE *CYSH*

I.13.1. Nodulación y fijación de nitrógeno

I.13.1.1. Inoculación y cultivo de las plantas

Con el fin de estudiar la capacidad del mutante *cysH* para inducir la formación de nódulos y fijar nitrógeno en plantas de guisante, se utilizaron semillas de guisante de la variedad comercial Avola, de rápido crecimiento, las cuales se esterilizaron en una campana de flujo laminar, según el método descrito por Poole et al. (1994). Para ello, se sumergieron durante 1 min en etanol al 70%, y después de aclararlas con agua destilada estéril, se sumergieron durante 5 min en hipoclorito sódico (NaClO) al 2%. Tras varios lavados con agua destilada estéril para eliminar los restos de hipoclorito, se sembraron en botes de 1 lt (dos semillas por bote), con vermiculita fina estéril, y 400 ml de solución nutritiva sin nitrógeno para plantas, también estéril (nitrogen-free rooting solution, Poole et al., 1994), cuya composición se detalla en la siguiente tabla:

Tabla I.9: composición de la solución nutritiva “nitrogen-free rooting solution”

Macronutrientes		Micronutrientes	
KH ₂ PO ₄	3.67 mM	H ₃ BO ₃	4 µM
Na ₂ HPO ₄	3.82 mM	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.9 µM
K ₂ SO ₄	1.25 mM	CuSO ₄ · 5H ₂ O	1 µM
KH ₂ PO ₄	0.25 mM	NaMoO ₄ · H ₂ O	0.1 µM
		MnSO ₄ · H ₂ O	6 µM
		Fe (Sequestrene)	16.6 mg l ⁻¹

Los inóculos de *R. leguminosarum* se obtuvieron a partir de cultivos del mutante *cysH* y de la cepa parental, crecidos durante tres días en medio TY con antibióticos (estreptomicina para Rlv3841 y estreptomicina mas neomicina para *cysH*). Los cultivos se resuspendieron en 5 ml de agua milliQ estéril, y se diluyeron en una proporción 1:10. Las semillas de guisante se inocularon con la cepa parental o el mutante *cysH* añadiendo 1 ml de la suspensión celular diluida a cada semilla. Se incluyó un grupo de semillas sin inocular como control, para evaluar la posible contaminación cruzada entre cepas. Tras la inoculación los botes se cubrieron con plástico estéril para evitar contaminación cruzada entre cepas, y se cultivaron en una cámara de crecimiento a 22° C, con un ciclo de luz de 16/8 h (dia/noche). A los 5 días

de la siembra, se realizó una incisión en el plástico que cubría cada bote con un bisturí esterilizado con etanol, para permitir la salida de las plántulas, y se eliminó de cada bote la semilla no germinada o la plántula más pequeña. A las 3 semanas de la germinación (26 días después de la siembra), se cosecharon las plantas y se midió en ellas la fijación de nitrógeno.

I.13.1.2. Fijación de nitrógeno (Actividad Reductora de Acetileno)

En condiciones fisiológicas normales, la nitrogenasa reduce el N atmosférico hasta amonio. Sin embargo, la enzima puede utilizar otros sustratos como cianuro, azida o acetileno. La medición de la actividad reductora de acetileno (ARA) se basa en esta capacidad que tiene la nitrogenasa para reducir acetileno hasta etileno, y la posterior cuantificación del etileno producido, después de la incubación con acetileno a una concentración conocida. El método utilizado fue el descrito por Trinick et al. (1976). Para ello, las plantas de guisante inoculadas con la cepa mutante LMB627 (*cysH*) y con el parental 3841 (5 plantas por cada cepa) se cosecharon a los 26 días de su germinación, y cada planta se colocó en una botella de cristal Duran de 250 ml con cierre hermético, utilizando un tapón adaptado con tapa doble de goma, que permite la entrada de una aguja pero impide la salida de aire de la botella. Debajo de cada planta, en el fondo de la botella, se colocó un papel húmedo para evitar que la raíz se secase durante el experimento. Una vez selladas todas las botellas, se extrajo un 5% (v/v) del volumen de aire contenido en cada botella con una jeringa, y se reemplazó por el mismo volumen de acetileno, procedente de una botella de este gas comprimido. Tras una hora de incubación con el acetileno a 26° C, se tomaron 3 muestras de 1 ml del aire contenido en cada botella, con jeringas pequeñas, pinchándolas en un tapón de goma para evitar fugas del gas. Las muestras de gas contenidas en las jeringas se analizaron por cromatografía de gases (GC), inyectándolas en la columna de 2 m de largo de un cromatógrafo de gases Varian STAR 3400 cx, equipado con un detector de ionización de llama (FID) que trabajó a una temperatura de 120° C y a una presión de gases de 140 kPa. La tasa de reducción de acetileno, como medida indirecta de la actividad nitrogenasa, se calculó para cada planta como la relación entre el porcentaje de etileno y acetileno en las muestras inyectadas, y asumiendo que 1 mol de acetileno ocupa

22.41 lt en condiciones normales de temperatura y presión, según la constante de los gases.

Estos valores son una medida relativa de la actividad nitrogenasa, ya que a tiempos largos, puede producirse una inhibición de la actividad nitrogenasa por el propio acetileno (Vadez and Sinclair, 2000). A pesar de las limitaciones de esta técnica, resulta útil para hacer mediciones relativas, y comparación de la capacidad fijadora entre distintas cepas de rizobios, como es este caso. En cualquier caso los valores obtenidos mediante esta técnica se confrontaron mediante la determinación de la ANA (ver apartado I.5.4 de Materiales y métodos) en otro experimento posterior.

I.13.1.3. Comprobación del fenotipo en bacterias aisladas de plantas

Con el fin de comprobar si los bacteroides procedentes de mutantes *cysH* mantenían su fenotipo en simbiosis con plantas de guisante, se recuperaron bacterias sin diferenciar a partir de nódulos de plantas inoculadas con esta cepa, y se estudió su resistencia a neomicina, fenotipo asociado a la inserción del plásmido recombinante en los mutantes *cysH*. Para ello, se escogieron 5 nódulos por cada planta inoculada con *cysH*, y se esterilizaron superficialmente con hipoclorito sódico (NaClO) al 2% durante 5 min. Tras numerosos lavados con agua destilada estéril, cada nódulo se machacó y se mezcló con 100 µl de agua estéril, para permitir la disgregación de las estructuras celulares y la salida de los bacteroides y las bacterias sin diferenciar. La suspensión correspondiente a cada nódulo se extendió mediante siembra en estría en placas con agar TY, y tras tres días de incubación a 27° C, se escogieron 10 colonias aisladas y cada una se subcultivó en agar TY y agar TY con neomicina, mediante un palillo estéril. Las colonias que han crecido en presencia de neomicina (Neo^R) tras tres días de incubación corresponderán a bacterias con fenotipo *cysH*.

I.13.2. Ensayo de competitividad por nodulación del mutante *cysH*

La capacidad relativa de una cepa bacteriana para infectar su planta hospedadora y desarrollar nódulos en presencia de otras cepas es conocida como “competitividad”. Con el fin de determinar el efecto de la interrupción y consiguiente pérdida de función del gen *cysH* en la competitividad para nodular de *R leguminosarum*, se realizó un

ensayo de competición para nodulación entre el mutante *cysH* y el parental 3841. Para ello, semillas de guisante de la variedad Avola se esterilizaron según el método del mutante *cysH* y de la cepa parental (co-inóculo), de manera que la proporción de concentraciones de bacterias entre las dos cepas era de $10^6:10^6$. Se establecieron dos grupos de plantas: uno se regó con solución nutritiva libre de nitrógeno (Tabla I.9; Poole et al., 1994), y otro se regó con la misma solución nutritiva, pero libre de azufre, en la cual las sales de azufre ($MgSO_4$ y $CuSO_4$) han sido reemplazadas por cloruros, en concentraciones equimolares. Las plantas crecieron durante 4 semanas en una cámara de crecimiento con condiciones controladas (apartado 1.13.1.1). Tras ese tiempo, se cosecharon 25 nódulos por planta (300 en total), se esterilizaron y machacaron según el método descrito en el apartado 1.13.1.3 y la suspensión se sembró en placas petri con medio TY. Después de tres días de incubación, se determinó el fenotipo de las bacterias aisladas sembrando cada colonia (10 por nódulo) en una placa de medio TY con estreptomicina y en otra placa de medio TY con estreptomicina y neomicina. La capacidad para nodular de la cepa mutante *cysH* se evaluó calculando el porcentaje de colonias resistentes a estreptomicina y neomicina (mutante *cysH*) en relación a las colonias resistentes a estreptomicina (cepa parental más *cysH*), en colonias analizadas después de tres días de incubación.

CHAPTER 1

Responses of nodulated pea plants (Pisum sativum L.) to sulphur deficiency are dependent on nodule developmental stage: physiological and metabolic implications

1.1. INTRODUCTION

Leguminous plant species require large inputs of sulphur, probably due to their high protein content, especially in seeds. S-containing amino acids methionine (Met) and cysteine (Cys) are necessary for the biosynthesis of protein in the seeds of legumes. Several studies have reported decreases in the nutritional quality of seeds under a suboptimal S supply, caused by the down-regulation of the synthesis of such S-containing amino acids, (Gaylor and Sykes, 1985; Chandler et al., 1983). Methionine and cysteine are both essential amino acids in human and animal nutrition, so S-deprived legumes may have a lower nutritional value (Sexton et al., 1997). Despite being a major source of vegetable protein for human and animal food worldwide, legumes are particularly poor in these amino acids. Thus, in recent years, much of the effort has been focused on an improvement in the content of Met and Cys in legume seeds via biotechnological approaches (Paek et al., 1997; Molvig et al., 1997). In this sense, Tabe et al. (2010) found that the overexpression of SAT in mutant embryos of the grain legume lupin led to an increase of up to 26-fold in free cysteine, but this increase did not have any effect in the levels of both Cys and Met in the mature seeds.

S metabolism and S-containing compounds have been shown to play important roles in the establishment and function of N₂-fixing symbiosis. S is an essential element of the metal-S clusters present in bacteroid proteins involved in the process of symbiotic nitrogen fixation, such as the components of the nitrogenase complex (Scherer 2001; Smith, 2002). Exchange of sulphate inside the nodule has been also shown to be essential for an effective symbiosis in *Lotus japonicus*, based on mutant analysis of a nodule-specific sulphate transporter, identified in the symbiosome membrane (Wienkoop and Saalback, 2003; Krussel et al 2005). However, giving the differences between different leguminous species regarding their metabolism, and the type of nutrients offered to their microsymbionts, these results cannot be extrapolated from the symbiosis *Lotus japonicus-Mesorhizobium loti* to other symbiotic system (Krussel et al., 2005). Also, in some leguminous species belonging to the IRLC clade (which includes common temperate legumes such as *Medicago* and *Pisum*), differentiation of bacteroids inside the nodules is driven by NCR peptides, a family of peptides rich in cysteine, which force bacteroid to endoreduplication and

differentiation to terminal bacteroids (Terpolilli et al., 2012). This phenomenon seems to be essential for nitrogen fixation in these symbioses, and thus provision of sulphur would be essential to ensure high levels of cysteine for the synthesis of NCR in these species.

Besides, nodule proteome analyses performed by Larrainzar et al (2007; 2014) in *Medicago truncatula* plants revealed that nodules are important sites for S assimilation in legumes. In these studies, apart from the known enzymes involved in N assimilation in nodules, several enzymes related to the sulphur assimilation pathway and the biosynthetic pathways of methionine and ethylene were identified in nodule plant fraction.

Regarding traits associated with nitrogen fixation, Scherer and Lange (1996) reported lower plant growth in S-deficient leguminous plants, and Lange (1998) suggested a decrease in nitrogen fixation as the main cause of this decrease in plant growth. In other studies, S deficiency resulted also in a lower nodule biomass, as well as a decrease in the activity and content of nodule-containing proteins (Varin et al., 2010; Scherer et al., 2008; Zhao et al., 1999). Other authors established that the lack of S causes a decrease in nodule growth, which is responsible for the low N₂ fixation observed (Schulze and Drevon, 2005; Habtemichial et al. 2007), as well as for a down-regulated nodule metabolism (Pacyna et al., 2006, Scherer et al., 2008).

Very recently, an integrative view of legume metabolic responses to sulphur deficiency was proposed by Zuber et al. (2013), based on a exhaustive study in which a phenotypic characterization, along with metabolomic and transcriptomic analysis were performed in *Medicago truncatula* plants subjected to sulphur restriction at various developmental stages. In this study, the relative levels of transcripts and metabolites related with S assimilation in leaves were analyzed, including a sulphate transporter, whose transcript levels shown an increase of 2-fold when S-deficiency was applied at flowering. Furthermore, the levels of some sugars such as sucrose, glucose or raffinose family oligosaccharides decreased in seeds of S-deprived plants, when this limitation was applied at the mid-vegetative stage. These analyses were made in nitrate-fed *Medicago* plants, and giving the metabolic differences between nitrate-fed and nodulated leguminous plants, the latter might have different responses to sulphur

limitation; however, this study demonstrate that sulphur deficiency has different effects depending on the developmental stages at which is applied.

Despite all these agronomic, physiological and molecular approaches, it is still not clear which process of plant metabolism is mainly affected by S deficiency: (a) nodule development and growth, provoking an impaired BNF as a response, or (b) a direct effect of S in N₂ fixation and nodule metabolism, which may cause a decrease in nodule growth by a feed-back mechanism. Some of these authors proposed that the low nitrogenase activity observed in S-deficient plants may be due either to a limitation in the energy supply to the bacteroid caused by a downregulation of PEP carboxylase, or by a decrease in leghaemoglobin and ferredoxin concentrations (Pacyna et al., 2006, Scherer et al., 2008), whereas Varin et al. (2010) proposed that S deficiency inhibited nodulation to a greater extent than N₂ fixation in white clover.

1.2. OBJECTIVES

The role of S in symbiotic N fixation is not well established, and there is scarce information about its effect at a biochemical level. In addition, none of these studies deep into the specific effects of S in each stage of nodule development. Voisin et al. (2010) established that symbiotic N fixation started 6 to 9 days after the onset of nodule initiation, and we determined, in a previous experiment, that nodules of pea plants growth in hydroponic culture, are visible and mature (with active leghaemoglobin) between 11 and 14 days after the first inoculation.

The main objective of this work was to gain further insights into the responses of nodulated pea plants to S deficiency at two stages of nodule development: (I) first stages of nodulation and nodule development, and (II) stage of mature nodule.

1.3. EXPERIMENTAL PROCEDURES

Ten days after sowing and seven days after first inoculation, pea (*Pisum sativum* L.) seedlings inoculated with *R. leguminosarum* were transferred to individual pots (1 L each one) with an aerated Kalia and Drevon hydroponic solution, and S-limited treatments were applied as detailed in Material and methods (section I.4.1.1). 28 days after transplanting, the following physiological parameters were determined:

- Growth parameters (root, shoots and nodule FW) (section I.5.5)
- Photosynthesis (section I.5.2)
- Chlorophyll content (SPAD) (section I.5.3)
- Nitrogen fixation (ANA) (section I.5.4)

Also, the following biochemical parameters were determined in shoots, root and nodules of control, -S 21D and -S 28D plants:

- Mineral elements (I.5.6)
- Amino acid and aminothiols (I.6.4)
- Sulphate and organic acids (I.6.3)
- Carbohydrate determination (I.6.2)
- Nodule enzymatic activities (I.7)

Methods used for the determination of physiological and biochemical parameters are described in the corresponding section of Material and methods. The whole experiment was repeated twice with five replicates per treatment. Results were subjected to analysis of variance and comparison of means by ANOVA. Significant differences were determined using Tukey test at $p \leq 0.05$ significance level.

1.4. RESULTS

1.4.1. Growth and physiological parameters

Plant growth, expressed as shoot and root fresh weight, was not significantly affected after 4 weeks of culture in both S starvation treatments described (table 1.1), although shoot/root ratio was significantly lower in -S 21D and -S 28D plants (table 1.1). Also, nodule fresh weight in -S 28D plants experienced nearly a 50 % reduction compared with control plants, while nodule biomass decline in -S 21D plants was c.a. 33% (figure 1.1C).

Table 1.1: Shoot and root biomass and shoot/root ratio in control, -S 21D and -S 28D plants after 4 weeks of growth. Mean \pm SE (n = 9). Numbers followed by a different letter within a row are significantly different at $p \leq 0.05$

	Control	-S 21D	-S 28D
Shoot FW (g plant ⁻¹)	6.53 \pm 0.48a	5.95 \pm 0.58a	5.43 \pm 0.43a
Root FW (g plant ⁻¹)	6.45 \pm 0.63a	7.31 \pm 0.80a	6.78 \pm 0.84a
Shoot/root ratio	1.06 \pm 0.08a	0.83 \pm 0.06b	0.83 \pm 0.06b

Photosynthetic rate was significantly lower in -S 28D plants compared with control ones, although no significant differences were found for -S 21D plants (figure 1.1 A); also, nitrogen fixation, measured as ANA (figure 1D) decreased significantly in both -S 21D and -S 28D treatments in a similar way than nodule biomass.

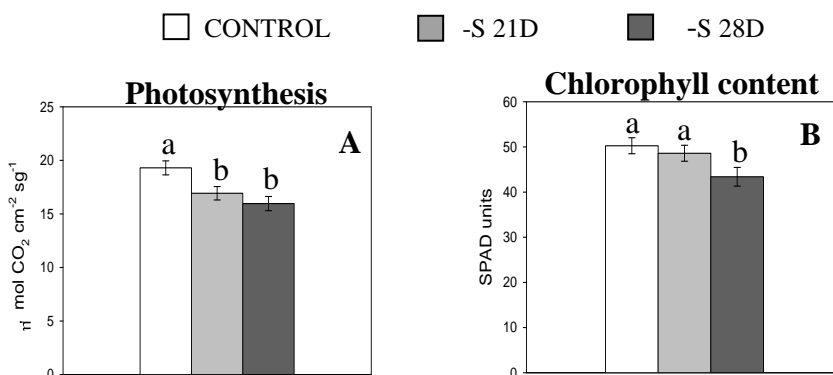


Figure 1.1: Photosynthesis (A) and chlorophyll content (B), in control, -S 21D and -S 28D plants after 4 weeks of growth. Mean \pm SE (n = 9). Different letters on bars indicate significant differences between treatments at $p \leq 0.05$.

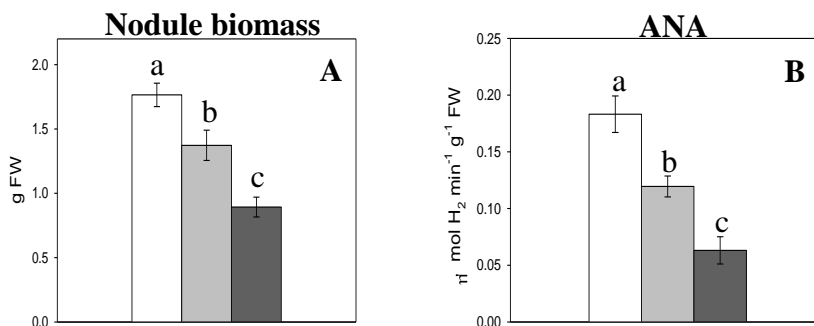
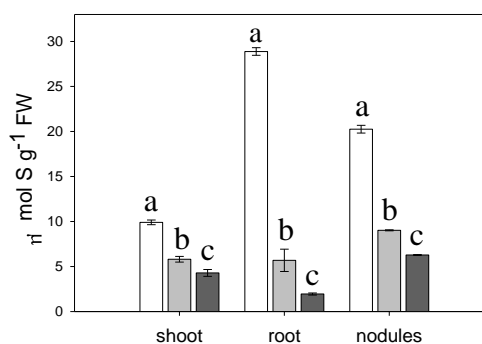


Figure 1.2: Nodule biomass (A) and apparent nitrogenase activity (ANA) (B) in control, -S 21D and -S 28D plants after 4 weeks of growth. Mean \pm SE (n = 9). Different letters on bars indicate significant differences between treatments at $p \leq 0.05$. Legend as in figure 1.1.

1.4.2. Mineral elements and sulphate content

S content was significantly reduced in shoot, root and nodules of -S 21D and -S 28D plants. In nodules of control plants there were a high concentration of sulphur (more than in shoots) and in both -S 21D and -S 28D treatments it diminished c.a. 50% and c.a. 66% respectively. However, when we focused on the S content in shoot, root and nodules of each treatment, a significant accumulation of S was noticed in the nodules of the two S-deprived treatments. In control plants the highest concentration of S was found in roots, while -S 21D and -S 28D plants have their highest concentration of S in nodules (figure 1.3).

Figure 1.3: Total sulphur content in control, -S 21D and -S 28D plants after 4 weeks of growth. Mean \pm SE (n = 5). Different letters within each group of bars indicate significant differences between treatments at $p \leq 0.05$. Legend as in figure 1.1.



Results of mineral analysis are summarised in tables 1.2 A and B. Content of some other elements was affected by sulphur deprivation: potassium (K) concentration decreased significantly in -S 28D roots, and phosphorous (P) content was lower in shoot, root and nodules of -S 28D plants and in root and nodules of -S 21D plants (table 1.2A). By contrast, concentration of magnesium (Mg), calcium (Ca) and sodium (Na) were not significantly affected.

Table 1.2: Mineral composition of shoot, root and nodule in the three treatments described (control, -S 21D and -S 28D) after 4 weeks of growth. Mean \pm SE (n = 9) Numbers followed by a different symbol within a row are significantly different at $p \leq 0.05$.

A) Content of macronutrients (sulphur, potassium, calcium, sodium, magnesium, phosphorus) ($\mu\text{mol g}^{-1}$ FW)

		Control	-S 21D	-S 28D
S	Shoot	9.91 \pm 0.26 a	5.81 \pm 0.32 b	4.29 \pm 0.38 c
	Root	28.88 \pm 0.42 a	5.68 \pm 1.24 b	1.95 \pm 0.11 c
	Nodules	20.25 \pm 0.43 a	9.02 \pm 0.06 b	6.28 \pm 0.18 c
K	Shoot	116.9 \pm 3.0 a	115.9 \pm 6.4 a	99.8 \pm 4.2 b
	Root	134.7 \pm 0.9 a	116.8 \pm 9.1 ab	113.7 \pm 3.3 b
	Nodules	125.2 \pm 2.0 a	117.6 \pm 1.4 a	102.0 \pm 2.3 a
Ca	Shoot	52.6 \pm 1.4 a	54.1 \pm 2.9 a	48.4 \pm 3.1 a
	Root	61.5 \pm 3.0 a	62.8 \pm 11.2 a	40.5 \pm 2.7 a
	Nodules	30.0 \pm 1.4 a	45.8 \pm 2.7 a	22.2 \pm 2.3 a
Na	Shoot	1.94 \pm 0.13 a	1.90 \pm 0.20 a	1.88 \pm 0.13 a
	Root	3.65 \pm 0.24 a	3.77 \pm 0.45 a	3.13 \pm 0.77 a
	Nodules	2.64 \pm 0.07 a	3.75 \pm 0.08 a	2.80 \pm 0.09 a
Mg	Shoot	18.26 \pm 0.98 a	25.11 \pm 1.40 b	21.91 \pm 1.59 ab
	Root	9.24 \pm 0.87 a	7.21 \pm 0.58 a	8.70 \pm 0.33 a
	Nodules	10.36 \pm 0.23 a	10.85 \pm 0.06 a	8.97 \pm 0.26 a
P	Shoot	23.7 \pm 1.2 a	20.5 \pm 1.5 ab	18.4 \pm 0.9 b
	Root	26.9 \pm 3.0 a	17.0 \pm 2.3 b	18.4 \pm 1.6 b
	Nodules	21.8 \pm 0.3 a	17.6 \pm 0.1 b	13.7 \pm 0.1 b

B) Content of micronutrients (iron, aluminium, boron, manganese, copper, nickel, zinc, chromium) (nmol g⁻¹ 10⁻² FW)

		Control	-S 21D	-S 28D
Fe	Shoot	23.7 ± 2.1a	20.4 ± 1.1a	18.9 ± 2.1a
	Root	33.4 ± 1.9a	36.1 ± 5.1a	34.1 ± 2.7a
	Nodules	56.4 ± 1.1 a	76.1 ± 0.6 b	72.5 ± 1.1 b
Al	Shoot	9.48 ± 0.80a	10.80 ± 1.52a	9.78 ± 1.16a
	Root	34.75 ± 3.30a	29.81 ± 5.67a	30.92 ± 4.93a
	Nodules	16.75 ± 1.13 a	28.28 ± 0.79 b	30.56 ± 0.10 b
B	Shoot	20.56 ± 0.82a	20.97 ± 1.82a	18.28 ± 0.67a
	Root	7.84 ± 0.09a	7.74 ± 0.49a	7.29 ± 0.20a
	Nodules	7.46 ± 0.08a	9.46 ± 0.91a	8.43 ± 0.40a
Mn	Shoot	28.6 ± 2.6 a	21.3 ± 0.8 b	18.2 ± 1.3 b
	Root	148.1 ± 18.3 a	99.8 ± 15.0 ab	80.0 ± 7.4 b
	Nodules	32.2 ± 0.7a	38.7 ± 1.2a	34.8 ± 1.1a
Cu	Shoot	1.09 ± 0.03a	1.13 ± 0.05a	1.05 ± 0.10a
	Root	2.15 ± 0.13 a	2.09 ± 0.07 a	1.83 ± 0.09 b
	Nodules	2.36 ± 0.05 a	3.14 ± 0.03 b	3.33 ± 0.04 b
Ni	Shoot	0.16 ± 0.02a	0.25 ± 0.09a	0.14 ± 0.07a
	Root	0.26 ± 0.03a	0.29 ± 0.04a	0.25 ± 0.03a
	Nodules	0.35 ± 0.01 a	0.59 ± 0.02 b	0.54 ± 0.02 b
Zn	Shoot	10.97 ± 0.56a	11.03 ± 0.70a	9.70 ± 0.52a
	Root	9.25 ± 0.68a	9.49 ± 1.10a	10.34 ± 0.65a
	Nodules	12.47 ± 0.26a	12.65 ± 0.05a	10.63 ± 0.11a
Cr	Shoot	1.73 ± 0.30a	1.36 ± 0.20a	1.15 ± 0.19a
	Root	0.72 ± 0.04 a	0.35 ± 0.06 b	0.63 ± 0.11 ab
	Nodules	0.16 ± 0.00 a	0.31 ± 0.01 b	0.22 ± 0.00 ab

Regarding micronutrients, the most remarkable effect of sulphur deprivation was an increase of iron (Fe), aluminium (Al), nickel (Ni) and copper (Cu) in nodules of both S-deficient treatments. Also, manganese content showed a significant decrease on shoot and root of -S 28D plants (table 1.2B).

Free sulphate diminished drastically in S-deprived treatments with respect to control, for the three organs analyzed (shoots, roots and nodules), especially in roots (it

was diminished over 10-fold) (table 1.3). Highest accumulation of SO_4 was found in roots of control plants.

Table 1.3: Free sulphate (SO_4^{2-}) in root, shoot and nodules of described treatments (control, -S 21D and -S 28D) after 4 weeks of growth. Mean \pm SE (n = 5) Numbers followed by a different letter within a row are significantly different at $p \leq 0.05$.

	Control	-S 21D	-S 28D
Shoot	$3.55 \pm 0.64\text{a}$	$0.92 \pm 0.12\text{b}$	$0.85 \pm 0.05\text{b}$
Root	$24.50 \pm 2.00\text{a}$	$1.91 \pm 0.96\text{b}$	$0.85 \pm 0.08\text{b}$
Nodules	$13.14 \pm 1.42\text{a}$	$2.07 \pm 0.69\text{b}$	$0.94 \pm 0.05\text{b}$

1.4.3. Amino acids

Total amino acids concentration was similar for the three treatments; a high concentration was found in nodules for all treatments, while roots showed the lowest content (table 1.4).

Table 1.4: Total amino acids concentration ($\mu\text{mol aa g}^{-1}$ FW) in shoot, root and nodules of described treatments (control, -S 21D and -S 28D) after 4 weeks of growth. Mean \pm SE (n \geq 6) Numbers followed by a different letter within a row are significantly different at $p \leq 0.05$

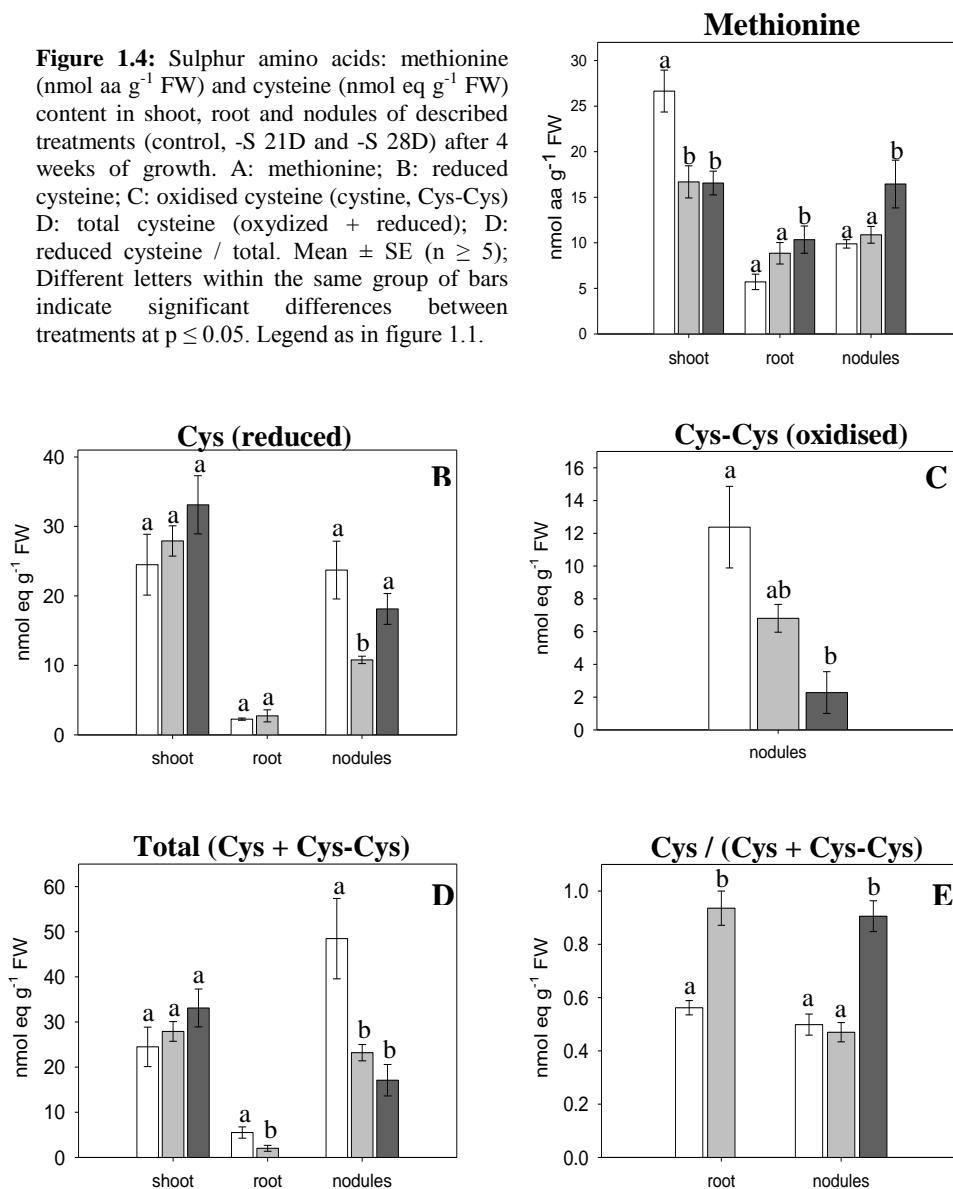
	Control	-S 21D	-S 28D
Shoot	$15.9 \pm 1.0\text{a}$	$19.5 \pm 1.3\text{a}$	$17.7 \pm 0.8\text{a}$
Root	$5.99 \pm 0.81\text{a}$	$6.66 \pm 0.48\text{a}$	$7.94 \pm 0.60\text{a}$
Nodules	$20.6 \pm 0.74\text{a}$	$19.3 \pm 1.10\text{a}$	$18.3 \pm 1.12\text{a}$

1.4.3.1. S-containing amino-acids

Methionine concentration diminished significantly in shoots of -S 21D and -S 28D plants, while it increased in root and nodules of -S 28D plants (figure 1.4A). The levels of cysteine also showed a trend to increase in S-deprived shoots, although it was not significant, whereas a decrease was observed in nodules of both S-deprived treatments, being significant in -S21D nodules (figure 1.4B). In roots, cysteine concentration was very low, around 3-4 nmol eq g FW⁻¹ in control and -S 21D plants, not being detected in -S 28D roots. Cystine (Cys-Cys) is the amino acid formed by the oxidation of two cysteine molecules that link via a disulphide bond. In our experiment, cystine was only detected in control roots, at very low concentration, around 2 nmol eq

g FW (data not shown), and in nodules, in which S deficiency provoked a significant decrease in cystine content (figure 1.4C). As a result, the total pool of cysteine and cystine decreased significantly in both S-deprived treatments (figure 1.4D). Also, all these data led to significant increases (c.a. 50%) in the ratio cysteine / (cysteine + cystine), in -S 21D roots and in -S28D nodules (figure 1.4E).

Figure 1.4: Sulphur amino acids: methionine (nmol aa g⁻¹ FW) and cysteine (nmol eq g⁻¹ FW) content in shoot, root and nodules of described treatments (control, -S 21D and -S 28D) after 4 weeks of growth. A: methionine; B: reduced cysteine; C: oxidised cysteine (cystine, Cys-Cys) D: total cysteine (oxydized + reduced); E: reduced cysteine / total. Mean \pm SE (n \geq 5); Different letters within the same group of bars indicate significant differences between treatments at $p \leq 0.05$. Legend as in figure 1.1.



1.4.3.2. Amino acids involved in nitrogen assimilation

Glutamine (Gln), aspartic acid (Asp) and glutamic acid (Glu) content in shoot and roots did not experience significant variations among the three treatments, except for glutamine in shoots (figures 1.5A, B and C). The lowest concentration was found in roots in all cases. The most remarkable variation was seen in nodules: the concentration of the three amino acids is significantly lower in both S-deprived treatments, compared with control plants concentration, and there are also differences between -S 21D and -S 28D treatments for Asp and Gln nodule concentration (figure 1.5C).

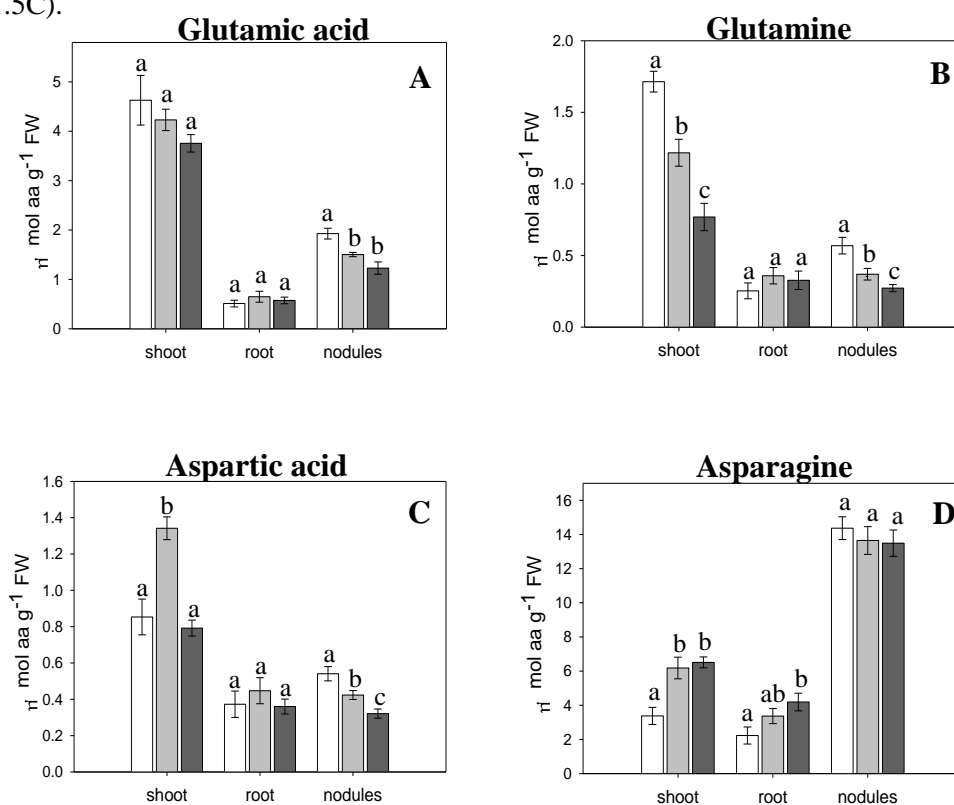


Figure 1.5: Glutamic acid (A), glutamine (B), aspartic acid (C) and asparagine (D) ($\mu\text{mol aa g}^{-1}$ FW) content in shoot, root and nodules of described treatments (control, -S 21D and -S 28D) after 4 weeks of growth. Mean \pm SE ($n \geq 6$) Different letter within the same group of bars indicate significant differences between treatments at $p \leq 0.05$. Legend as in figure 1.1.

Asparagine was accumulated in nodules for the three treatments (figure 1.5D), being the major amino acid found in nodules (more than 60% of total nodule amino acid concentration corresponds to Asn in all treatments), with no differences between

treatments. Instead, Asn content was significantly higher in -S 28D shoots and roots, and in -S 21D shoots (figure 1.5D).

1.4.3.3. Branched-chain amino acids

In nodules of -S 28D plants, branched-chain amino acids content (valine, isoleucine and leucine) was significantly higher than in control plants nodules. Moreover, valine concentration also increased significantly both in shoots and roots of -S 28D plants (figure 1.6). No significant changes in branched-chain amino acids were found for -S 21D plants.

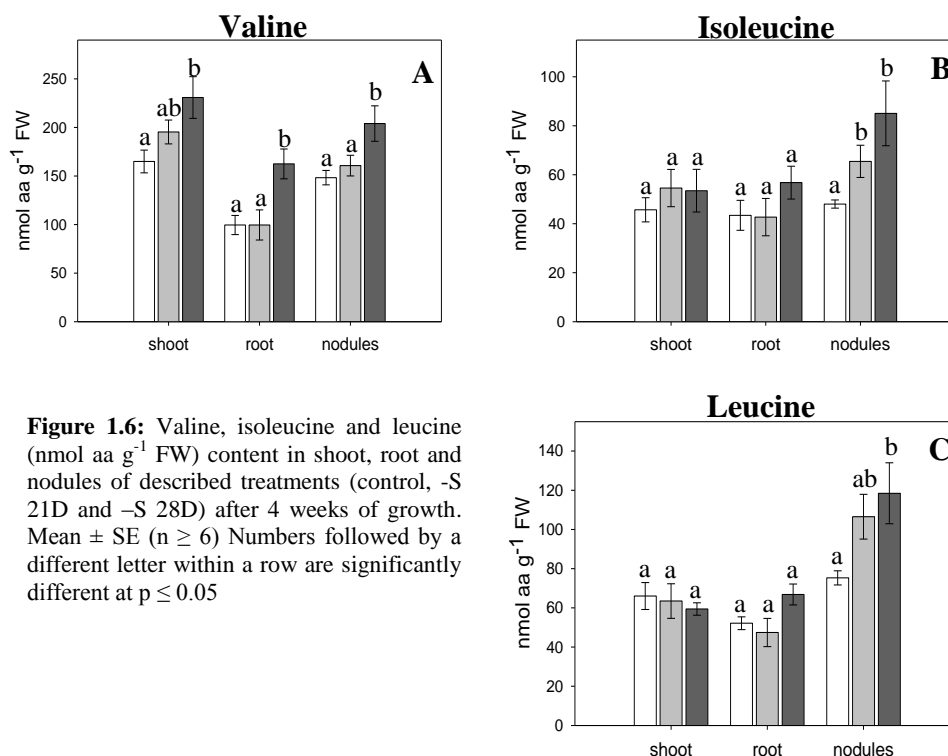


Figure 1.6: Valine, isoleucine and leucine (nmol aa g⁻¹ FW) content in shoot, root and nodules of described treatments (control, -S 21D and -S 28D) after 4 weeks of growth. Mean \pm SE (n \geq 6) Numbers followed by a different letter within a row are significantly different at $p \leq 0.05$

1.4.3.4. Aromatic amino acids

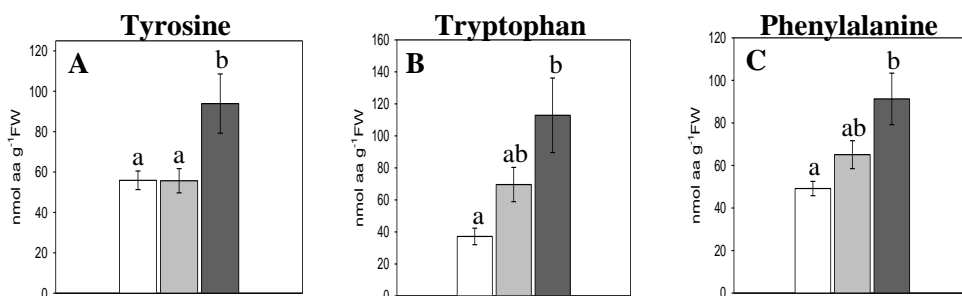


Figure 1.7: Tyrosine, tryptophan and phenylalanine (nmol aa g⁻¹ FW) content in nodules of described treatments (control, -S 21D and -S 28D) after 4 weeks of growth. Mean ± SE (n ≥ 6). Numbers followed by a different letter within a row are significantly different at p ≤ 0.05. Legend as in figure 1.1.

Content of tryptophan and phenylalanine showed a significant increase in -S 28D nodules (figure 1.7), in a similar way than described above for branched-chain amino acids, whereas tyrosine nodule content did not show any change. In contrast, there was an accumulation of tyrosine in -S 21D and -S 28D shoots, while no differences were found for phenylalanine and tryptophan content in shoot and roots between treatments (table 1.5)

Table 1.5: Tyrosine, tryptophan and phenylalanine (nmol aa g⁻¹ FW) content in shoot and root of described treatments (control, -S21D and -S28D) after 4 weeks of growth. Mean ± SE (n ≥ 6). Numbers followed by a different letter within a row are significantly different at p ≤ 0.05.

		Control	-S 21D	-S 28D
Tyrosine	Shoot	34.5 ± 8.0a	88.7 ± 11.0b	92.6 ± 11.8b
	Root	126.9 ± 14.9a	118.2 ± 11.3a	155.7 ± 15.1a
Tryptophan	Shoot	25.3 ± 5.1a	16.0 ± 2.4a	30.6 ± 8.3a
	Root	18.3 ± 4.1a	18.0 ± 5.2a	30.2 ± 7.3a
Phenylalanine	Shoot	132.0 ± 15.5a	121.1 ± 21.3a	151.8 ± 17.0a
	Root	33.0 ± 4.1a	33.4 ± 6.3a	48.7 ± 6.8a

1.4.3.5. Other amino acids

A strong accumulation of N-rich amino acids like arginine and histidine was observed for -S 28D roots (figures 1.8A and B). Arginine content also was significantly higher in -S 28D shoots and nodules, compared with control plants (figure 1.8A).

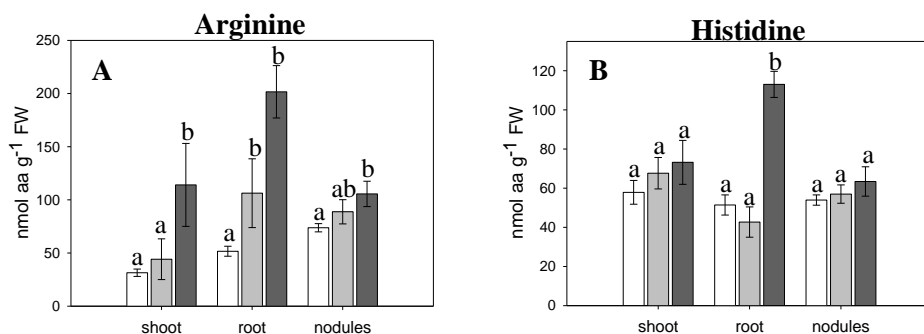


Figure 1.8: Arginine and histidine (nmol aa g⁻¹ FW) content in shoot, root and nodules of described treatments (control, -S 21D and -S 28D) after 4 weeks of growth. Mean \pm SE (n \geq 6) Numbers followed by a different letter within a row are significantly different at $p \leq 0.05$. Legend as in figure 1.1.

Non-protein amino acid GABA (γ -aminobutyric acid) showed a high concentration in control shoots, while it decreased more than 50% in -S 21D and -S 28D shoots (figure 1.9A). However, in -S 28D nodules, GABA content was significantly higher than in control and -S 21D nodules (figure 1.9B).

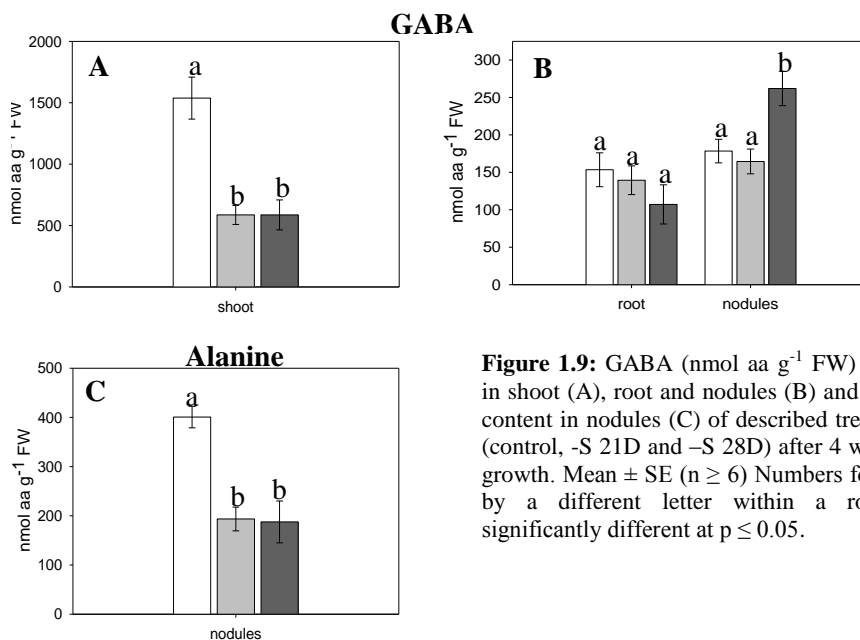


Figure 1.9: GABA (nmol aa g⁻¹ FW) content in shoot (A), root and nodules (B) and alanine content in nodules (C) of described treatments (control, -S 21D and -S 28D) after 4 weeks of growth. Mean \pm SE (n \geq 6) Numbers followed by a different letter within a row are significantly different at $p \leq 0.05$.

In contrast, alanine content experienced a marked decrease (c.a. 50%) in nodules of both -S 21D and -S 28D plants (figure 1.9C). However, alanine concentration

showed no significant changes between treatments neither for shoots nor for roots (table 1.6).

Table 1.5: Alanine, glycine-serine, lysine and threonine (nmol aa g⁻¹ FW) content in shoot, root and nodules of described treatments (control, -S21D and -S28D) after 4 weeks of growth. Mean \pm SE (n \geq 6) Numbers followed by a different letter within a row are significantly different at p \leq 0.05

		Control	-S 21D	-S 28D
Alanine	Shoot	1.92 \pm 0.15a	1.93 \pm 0.20a	1.55 \pm 0.22a
	Root	0.16 \pm 0.02a	0.23 \pm 0.03a	0.22 \pm 0.03a
	Nodules	0.4 \pm 0.02a	0.19 \pm 0.02b	0.19 \pm 0.04b
Glycine-serine	Shoot	1130 \pm 130a	1174 \pm 100a	1173 \pm 89a
	Root	459 \pm 44a	415 \pm 71a	564 \pm 75a
	Nodules	442 \pm 17a	409 \pm 25a	405 \pm 26a
Lysine	Shoot	89.9 \pm 15.7a	118.1 \pm 18.4a	146.8 \pm 26.3a
	Root	52.4 \pm 6.9a	61.7 \pm 14.7a	100.9 \pm 15.4 b
	Nodules	89.4 \pm 5.3a	64.4 \pm 3.7 b	104.5 \pm 7.7a
Threonine	Shoot	337.6 \pm 34.8a	474.8 \pm 47.4a	477.7 \pm 42.7a
	Root	131.1 \pm 18.3a	107.5 \pm 12.6a	177.6 \pm 24.8a
	Nodules	130.8 \pm 6.6a	128.9 \pm 8.5a	161.2 \pm 7.4 b

1.4.4. Amino thiols

Reduced glutathione (GSH) was the most abundant thiol found in all organs and treatments, and the highest concentration was found in nodules. S deficiency provoked a decrease in the levels of both reduced and oxidised (GSSG) glutathione in shoots (figure 10A and B). This decline was much more pronounced in -S 28D shoots, being around 8-fold for GSH, and more than 40-fold for GSSH content, compared with control values. Both GSH and GSSG were much less abundant in roots (c.a. 10 nmol eq g⁻¹ FW), and decreased significantly in -S 28D plants (figure 1.10A and B). Meanwhile, both GSH and GSSG levels decreased drastically in -S 28D nodules: 5-fold for GSSG and 10-fold for GSH. As a result, total pool of glutathione decreased in shoots and nodules of -S 21D and -S 28D plants, being significant for -S 21D shoots and -S 28D shoots and nodules (figure 1.10C). Also, the ratio GSH/(GSSG+GSH) increased in -S 28D shoots, while it was lower for -S 21D roots and nodules and also for -S 28D nodules (figure 1.10D).

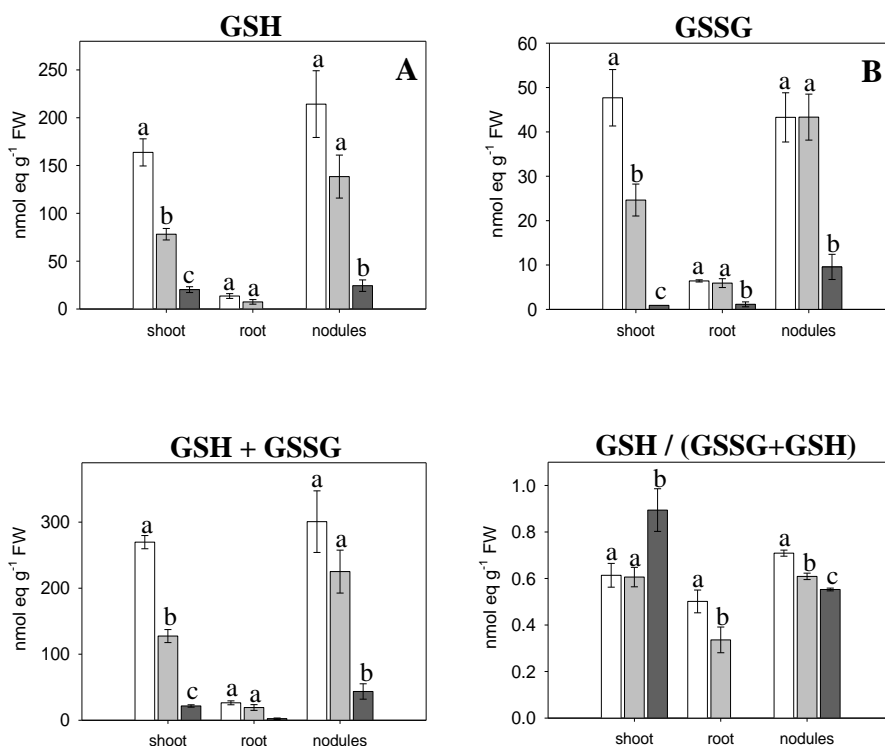


Figure 1.10: Glutathione content in roots and nodules of control, -S 21D and -S 28D plants after 4 weeks of growth. A: reduced (GSH); B: oxidized (GSSG); C: total (GSH + GSSG); D: GSH/(GSH + GSSG). Mean \pm SE (n = 5). Different letters within each group of bars indicate significant differences between treatments at $p \leq 0.05$. Legend as in figure 1.1.

Homoglutathione is a low molecular mass thiol found in certain legumes, analogue to glutathione, which contains alanine instead of glycine, and can be present also as reduced (hGSH) or oxidised (hGSSG) homoglutathione. In pea, homoglutathione content is relatively low, compared to glutathione content. In our experiment, neither hGSH nor hGSSG were detected in shoots, whereas hGSH levels in control roots were nearly 3-fold higher than those of GSH (Figure 1.11A and B). In nodules, total homoglutathione content was about 30% less than total glutathione nodule content for all treatments. S deficiency during 21 and 28 days provoked a marked decline in both hGSH and hGSSG content in root and nodules (Figure 1.11A and B). Neither hGSSG nor hGSH were detected in -S 28D roots, whereas in case of -S 28D nodules, values of hGSH and hGSSG were about 10-fold less than control values (Figure 1.11A and B). As a result, total pool of homoglutathione also showed a significant decrease in S deficient plants (Figure 1.11C). The hGSH/(hGSH+hGSSG)

ratio decreased in root and nodules after 21 days of S deprivation (-S 21D), and it was more pronounced for roots (50%). In contrast, this ratio increased after 28 days of S deprivation (Figure 1.11D).

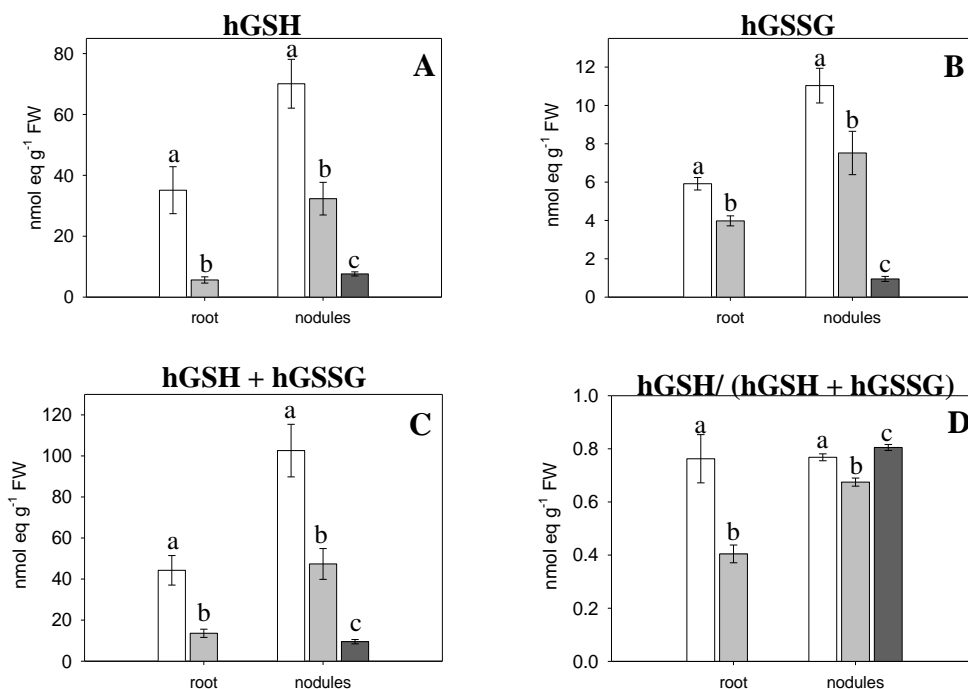
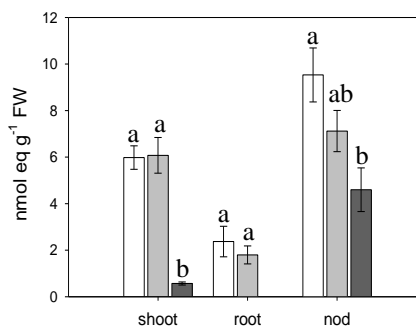


Figure 1.11: Homol glutathione content in roots and nodules of control, -S 21D and -S 28D plants after 4 weeks of growth. A: reduced (hGSH); B: oxydized (hGSSG); C: total (hGSH + hGSSG); D: hGSH/(hGSH+hGSSG). Mean \pm SE (n = 5). Different letters within each group of bars indicate significant differences between treatments at $p \leq 0.05$. Legend as in figure 1.

Gamma-glutamyl-cysteine (γ -Glu-Cys or γ -EC) is the biosynthetic precursor of both glutathione and homol glutathione, and is synthesized from cysteine. γ -Glu-Cys was determined in shoot, root and nodules along with the rest of aminothiols, and a decrease in -S 28D plants (in all tissues) was observed (figure 1.12). It should be noted that, in -S 28D shoots, this decrease was much more pronounced than in nodules (10-fold decrease in shoots vs. 2-fold in nodules, compared with control values); also, γ -Glu-Cys content in roots was lower than in shoots and nodules, and it was not detected in -S 28D roots. In contrast, S limitation for 21 days did not provoke any change in γ -Glu-Cys (figure 1.12).

Figure 1.12: gamma-glutamyl-cysteine (γ -Glu-Cys) content in shoot, root and nodules of control, -S 21D and -S 28D plants after 4 weeks of growth. Mean \pm SE (n = 5). Different letters within each group of bars indicate significant differences between treatments at $p \leq 0.05$. Legend as in figure 1.



Glutathione can be degraded via two main pathways in plants: one involves the formation of the precursor γ -Glu-Cys, but there is also an alternative pathway that produces the dipeptide cysteine-glycine (Cys-Gly), which can be further degraded to cysteine (Bergman and Rennenberg, 1993). It can be found also in the oxidised form, Gly-Cys-Cys-Gly, when the cysteine residues link via disulphide bonds. The most remarkable effect of S deficiency occurred in -S 28D shoots, in which a strong accumulation of reduced Cys-Gly (about 10-fold) was observed (figure 1.13A). Oxidised Cys-Gly also showed a significant accumulation in -S 21D shoots, whereas it was not detected in -S 28D shoots (figure 1.13B). These data led to an increase in the total pool of Cys-Gly (oxidised and reduced) in -S 28D shoots (figure 1.13C). Meanwhile, root Cys-Gly concentration was relatively low for all treatments, with values below 0.5 nmol g⁻¹ FW (data not shown). Also, Cys-Gly nodule content was not affected by S deficiency (figures 1.13 A, B and C).

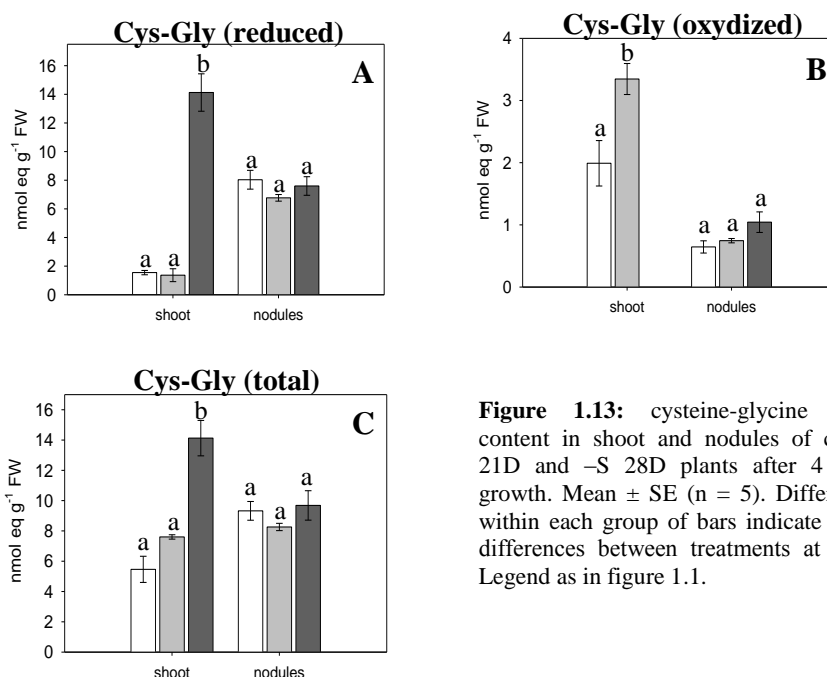


Figure 1.13: cysteine-glycine (Cys-Gly) content in shoot and nodules of control, -S 21D and -S 28D plants after 4 weeks of growth. Mean \pm SE (n = 5). Different letters within each group of bars indicate significant differences between treatments at $p \leq 0.05$. Legend as in figure 1.1.

1.4.5. Organic acids

Shoots of all treatments showed the highest content of malate. (figure 1.14A); malate content was lower in -S 28D plants shoots compared with levels in control and -S 21D shoots. In contrast, malate was significantly accumulated in root and nodules of both S-deprived treatments (figure 1.14A). Also, there was higher concentration of citrate in -S 28D shoots and nodules, and case of root, this accumulation was significant in both -S 21D and -S 28D (figures 1.15A and 1.15B). Regarding succinate, it decreased significantly in -S 28D shoots, and increased in -S 21D and -S 28D roots, compared with control shoots and roots (figure 1.14B).

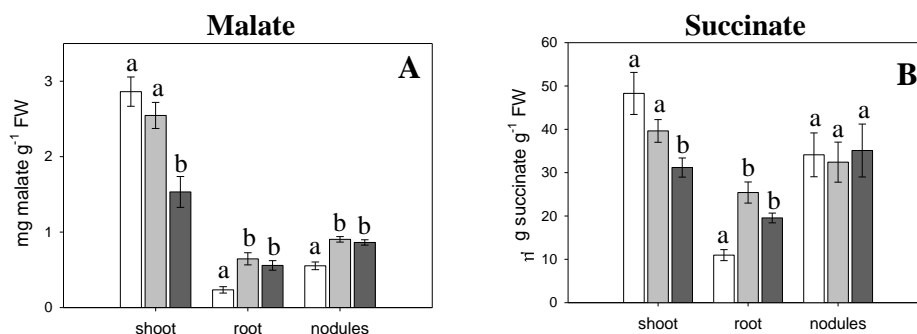


Figure 1.14: Malate and succinate levels in control, -S 21D and -S 28D plants after 4 weeks of growth. Mean \pm SE (n = 4). Different letters within each group of bars indicate significant differences between treatments at $p \leq 0.05$. Legend as in figure 1.1.

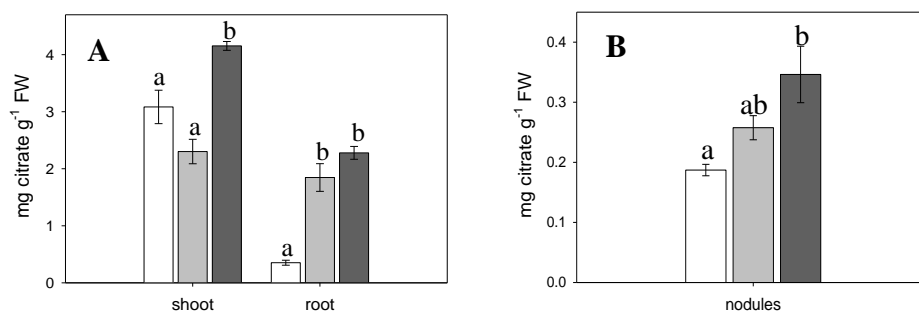


Figure 1.15: Citrate levels in shoot and roots (A) and in nodules (B) of control, -S 21D and -S 28D plants after 4 weeks of growth. Mean \pm SE (n = 4). Different letters within each group of bars indicate significant differences between treatments at $p \leq 0.05$.

1.4.6. Carbohydrates

Sucrose content decreased significantly in -S 28D nodules, although no significant differences between treatments were found for sucrose content neither in shoots nor in roots (table 1.5). Also, starch decreased significantly only in -S 28D nodules, while glucose showed a decline in nodules of both sulphur-deprived treatments.

Table 1.6: Sucrose (mg g^{-1} FW), glucose ($\text{mg} \cdot 10 \text{ g}^{-1}$ FW) and starch (mg glucose g^{-1} FW -after enzymatic digestion-) content in shoot, root and nodules of described treatments (control, -S 21D and -S 28D) after 4 weeks of growth. Mean \pm SE ($n \geq 6$). Numbers followed by a different letter within a row are significantly different at $p \leq 0.05$

		Control	-S 21D	-S 28D
Sucrose	Shoot	$16.70 \pm 1.77\text{a}$	$17.07 \pm 1.53\text{a}$	$18.07 \pm 2.02\text{a}$
	Root	$2.10 \pm 0.30\text{ab}$	$1.08 \pm 0.19\text{a}$	$2.73 \pm 0.36\text{b}$
	Nodules	$2.76 \pm 0.40\text{a}$	$2.33 \pm 0.52\text{a}$	$0.90 \pm 0.17\text{b}$
Glucose	Shoot	$15.79 \pm 4.61\text{a}$	$20.81 \pm 5.4\text{a}$	$32.1 \pm 8.99\text{a}$
	Root	$0.48 \pm 0.19\text{a}$	$0.29 \pm 0.09\text{a}$	$1.28 \pm 0.39\text{b}$
	Nodules	$1.85 \pm 0.59\text{a}$	$0.62 \pm 0.19\text{b}$	$0.62 \pm 0.16\text{b}$
Starch	Shoot	$55.6 \pm 14.9\text{a}$	$100.23 \pm 16.9\text{a}$	$77.1 \pm 11.3\text{a}$
	Root	$2.44 \pm 0.47\text{a}$	$2.26 \pm 0.70\text{a}$	$2.22 \pm 0.29\text{a}$
	Nodules	$32.64 \pm 2.64\text{a}$	$51.73 \pm 6.06\text{b}$	$6.58 \pm 3.13\text{c}$

1.4.7. Nodule enzyme activities

Regarding nodule enzymatic activities, there was a significant decline of SuSy and PEPC activities upon sulphur starvation (figure 1.16). However, it must be noted that the other carbon enzyme activities analysed (MDH, AI, IDCH, AAT, GOGAT) (table 1.7), remained unaffected.

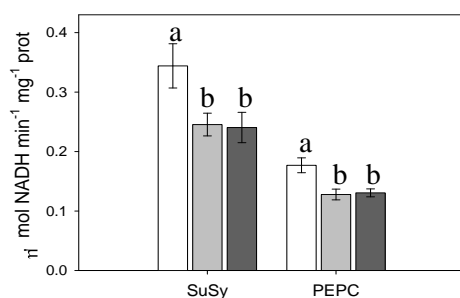


Figure 1.16: Nodule enzyme activities of in control, -S 21D and -S 28D plants. SuSy: sucrose synthase, PEPC: phosphoenolpyruvate carboxylase. Mean \pm SE ($n \geq 4$). Different letters within each group of bars indicate significant differences between treatments at $p \leq 0.05$.

Table 1.7: Nodule enzyme activities ($\mu\text{mol NAD(P)H min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein) of carbon metabolism in control, -S 21D and -S 28D plants. AI: alkaline invertase; ICDH: isocitrate dehydrogenase; MDH: malate dehydrogenase; GOGAT: Glutamate synthase; AAT: aspartate aminotransferase; Mean \pm SE ($n \geq 4$).

	Control	-S 21D	-S 28D
AI	0.281 ± 0.04	0.224 ± 0.02	0.287 ± 0.032
ICDH	0.319 ± 0.038	0.261 ± 0.028	0.355 ± 0.035
MDH	11.32 ± 0.38	10.86 ± 0.21	12.57 ± 0.74
GOGAT	0.091 ± 0.008	0.092 ± 0.003	0.099 ± 0.006
AAT	0.663 ± 0.119	0.642 ± 0.103	0.708 ± 0.120

1.5. DISCUSSION

Biological nitrogen fixation in legumes (BNF) is known to be dramatically affected by environmental constraints. Many studies have been conducted about the relationship between BNF and a wide range of environmental stresses, such as drought (Marino et al., 2006 and references therein), low temperatures, heavy metals and, to a lesser extent, mineral deficiencies. Nodule BNF has been shown to be more sensitive to environmental constraints than photosynthetic CO₂ assimilation (Durand et al. 1987; Serraj et al 1999). In our experiments, photosynthesis decreased significantly in both -S 21D and -S 28D treatments, but this decrease was less than 20% respect control values in both cases. Meanwhile, the decline in nitrogen fixation in -S 21D and -S 28D (measured as ANA) was ca. 33% and 66%, respectively. Decreases in photosynthesis in S-deficient conditions are well documented, and are mainly due to the role of S in the synthesis of chlorophyll and the formation of chloroplasts (Hawkesford and De Kok, 2007; Scherer 2001, and references therein).

Plant growth, expressed as shoot and root biomass, did not vary significantly, although shoot/root ratio was lower both in -S 21D and -S 28D. Similar examples for preferential partitioning of photosynthetic carbon to the roots and decrease in this ratio are well documented for other plants under several nutrient deficiencies, for such as nitrogen, phosphorous, or iron deficiencies (Fredeen et al., 1989; Peuke et al., 1994; Yeh et al., 2000). According to the model proposed by Thornley (1972), growth is dependent on the fluxes of carbon from shoot to roots (phloem transport) and that of nitrogen from roots to shoot (xylem transport). Thus, conditions which lead to an increase in carbon concentration, like mineral deficiencies, should lead to an increase in biomass partitioning towards the roots (Marschner et al., 1996).

Altogether, these results suggest that traits related to N₂ fixation are more dependent on S availability than those associated with the host plant, such as shoot and root growth, and photosynthesis (Varin et al., 2010). This can be explained by the role of S in the early moments of symbiosis establishment, stimulating the formation of nodules (Schwedock and Long, 1992; Crockard et al., 2002).

The high total S concentrations in nodules for all treatments confirms that nodules are a strong sink for S in legumes, as already pointed out by Scherer et al.

(2006) and Varin et al. (2010). As these authors suggested, these high S concentrations reflect the high S demand for nodule functioning. Both ferredoxin and nitrogenase contain Fe-S clusters and play a crucial vital role in N₂ fixation. The low levels of SO₄²⁻ found in all S-deprived tissues suggest the accumulation of S in plant tissues as S-containing molecules, remobilized by the plant in S-starving conditions. In fact, the highest concentration of S in –S 28D plants was found in nodules, suggesting a remobilization of S storage molecules from shoots and roots in S-starved conditions, to maintain nodule functioning. In this sense, analysis of the effect of S deficiency in shoots, roots and nodule content of S-aminoacids and aminothiols revealed that there was a strong decrease in nodule content of all these S-compounds, except methionine, for which a little increase (yet significant) in –S 28D nodules can be seen (Figure 1.4A). Regarding the main thiols analyzed (glutathione, cysteine and homoglutathione), their marked decline in S-deficient conditions in all tissues reflects their need S for effective symbiosis and nitrogen fixation. In fact, the degree of decline of glutathione and homoglutathione in both –S 21D and –S 28D nodules is similar to the decline in nitrogen fixation rates in these treatments (Figure 1.1B), reflecting a strong correlation between the N-fixation capacity and the nodule GSH content, as already pointed out by Groten et al. (2005). GSH and hGSH were shown to be also essential for the proper development of nodules (Frendo et al., 2005). The decrease of cysteine and other S compounds is a general response to S starvation in plants (Nikiforova et al., 2003; Hoefgen and Nikiforova, 2008).

It has been established by several authors that S assimilation, cysteine homeostasis and glutathione metabolism are interconnected and tightly regulated by S availability (Kopriva and Rennenberg, 2004; Hesse et al., 2004; Romero et al., 2014). GSH decline in –S 28D plants could be due both to its degradation and to a downregulation in its biosynthesis. This is supported by the drastic decrease in shoot concentration of its biosynthetic precursor, and the 10-fold accumulation of Cys-Gly, coming mainly from GSH degradation. GSH degradation has a number of physiological functions, and the main one is to provide Cys for protein synthesis and as a precursor for other metabolites (Ohkama-Ohtsu et al., 2008). GSH turnover in plants is still not well understood, and several pathways were proposed. In the most accepted

pathway, GSH is first degraded by γ -glutamyl transpeptidase (GGT) into its biosynthetic precursor, γ -Glu-Cys (γ -EC), which then releases Cys and Glu. In an alternative pathway, GSH breakdown would give Cys-Gly, which is further hydrolysed to Cys and Gly (Bergman and Rennenberg, 1993). According with our results, a strong accumulation of Cys-Gly occurs in -S28D shoots, concomitantly with a strong reduction of GSH shoot concentration in -S28D plants, supporting the occurrence of this alternative pathway for GSH catabolism, at least in pea.

As already exposed, the low N_2 fixation observed in -S 21D and -S 28D plants can be mainly explained by low nodulation, as BNF in both treatments decrease was proportional to the decline in nodule biomass. However, our biochemical approach shows that nodule metabolism was also markedly dependent on sulphate availability. The strong reduction of nodulation could result from an N feedback mechanism, as a significant accumulation of N-rich amino acids (Arg, His), was observed in both S-deprived treatments. It has been shown that such an accumulation can reduce nodule growth (Parson et al., 1993; Varin et al., 2010). Also, branched-chain amino acids (valine, leucine and isoleucine) accumulate significantly in -S 28D nodules, and leucine also in -S 28D roots. This was also observed by Galvez (2004) in pea nodules under drought. According to Royuela et al. (1998), such an increase might be caused by the high acetolactate synthase activity (ALS) found in bacteroids. This enzyme catalyzes the condensation of two molecules of pyruvate to synthesise acetolactate, which is the central point in the synthesis of branched-chain amino acids, which can be relevant in terms of the complex amino acid cycling between both partners occurring in nodules (Lodwig et al., 2003).

Aromatic amino acids (tyrosine, phenylalanine and tryptophan) content increased in nodules and roots of -S 28D plants. The same effect was found in nodules of drought-stressed *Medicago sativa* plants (Ladrera et al., 2007). Histidine and tryptophan were also accumulated in *Medicago truncatula* nodules in the early stages of drought, followed by an increase of valine, isoleucine and leucine at a later stage of drought, according to a metabolomic study performed by Larrainzar et al. (2009). These high concentrations of aromatic, branched-chain and N-rich amino acids reveal an imbalance in nodule C/N relation.

Nodule content of amino acids involved in ammonia assimilation (glutamine, glutamic acid and aspartic acid) decreased in S deficient conditions, probably due to the inhibition of nitrogen fixation in bacteroids and the subsequent decrease in ammonia export to the host cell cytosol. However, asparagine, the main amino acid involved in export of fixed nitrogen from nodules, showed a high concentration in nodules in all treatments.

Non-protein amino acid GABA (γ -aminobutyric acid) was another of the amino acids showing a significant increase in -S 28D nodules. GABA is known to accumulate in a variety of plant tissues under several stress conditions, like drought, hypoxia, cold, and mechanical manipulation (Serraj et al., 1998; Streeter and Thompson, 1972; Wallace et al., 1984; Bown and Shelp, 1989; Narayan and Nair, 1990). GABA is an abundant amino acid in nodules (Barsch et al., 2006; Miller et al., 1991), and $^{15}\text{N}_2$ labelling showed that GABA is rapidly labelled in pea nodules (Scharff et al., 2003) and in bacteroids (Prell et al., 2009). In contrast, GABA content showed an important decline (more than 50%) in -S 21D and -S 28D shoots, compared to control shoots values. According to Molero et al. (2011), GABA is likely to be transported from leaves and used as a C source by nodules. In fact, Prell et al (2009) suggested that GABA catabolism might play a role in the energy supply to bacteroids, and the same group characterised a GABA transport system in *Rhizobium leguminosarum* strains (White et al., 2009).

Regarding alanine decrease in S-deficient nodules, it could be a consequence of the decrease in nitrogen fixation by bacteroids. Hence, although traditionally it has been thought that bacteroids export fixed N in the form of ammonia, some experiments made up with isolated bacteroids suggest that alanine is also exported from bacteroids to host cell cytosol, and that this mechanism could be an alternative form of N transport (Waters et al., 1998).

The lower levels of malate observed in -S 28D shoots along with its accumulation in -S 21D and -S 28D roots and nodules is suggesting a remobilisation of this organic acid from shoots in S deficient conditions. Le Roux et al. (2008) also reported an increase in malate levels in P-deficient lupine nodules, along with a reduced N-fixing rate. Also, they observed an increase in PEPC activity as well as a

decrease in nodule amino acid content. In this study, malate accumulation in nodules can be explained by changes in C allocation between amino acid and organic acid pools in P-deficient conditions, evidenced by ^{14}C labelling analysis. Thus, they conclude that phosphorus deficiency can enhance malate synthesis in nodules, and that this excessive accumulation may inhibit N_2 fixation and nitrogen assimilation. In fact, *in vitro* studies have demonstrated that even modest increases in malate supply to isolated bacteroids could heavily impair N_2 fixation (Bergersen and Turner, 1990, 1993).

Nevertheless, in our studies, malate accumulation cannot be explained by this shift of PEPC-derived C from amino acids to organic acids; hence, as opposed to Le Roux et al. (2008), we observed a decrease in the activity of PEPC in both -S 21D and -S 28D nodules. In addition, nodule total amino acids pool was not affected by S deficiency. Thus, such malate accumulation could be either due to impairment in the transport system of malate and dicarboxylic acids to the bacteroids, or a downregulation of the tricarboxylic acids cycle, necessary for an adequate activity of the high energy-consuming nitrogenase complex. Regarding transport system, it was confirmed several years ago the presence of a dicarboxylic acids transporter in the peribacteroid membrane (PBM), with malate and succinate as preferred substrates (Udvardi et al., 1991), but it is still not well characterised. There is also a dicarboxylate transporter in the inner bacteroid membrane, called Dct system, which was biochemically and physiologically characterized (Glenn et al., 1980; Finan et al., 1983). Experimental evidence for the key role of dicarboxylic acids to fuel BNF was provided using a number of bacteria with mutations in membrane transporters (Finan et al. 1983, Whitehead and Day, 1997). According to Ladrera (2007) inhibition of nitrogen fixation in drought-stressed *Medicago truncatula* plants was previous to any decrease in the activity of the main enzymes involved in nodule C metabolism, and it provoked also an accumulation of malate in nodules. Nevertheless, this was not the situation observed in drought-stressed peas (González et al., 2005; Gálvez et al., 2005), so the relevance of this fact is still not clear. Interestingly, citrate, one of the main outputs of the tricarboxylic acids, was significantly accumulated in nodules of -S 21D and -S 28D.

Sucrose content decreased in -S 28D nodules, probably due to the decline in photosynthesis and the subsequent lack of photosynthates supply from shoots. Scherer et al (2006) also reported reduced amounts of sucrose in nodules of pea plants under S-deficiency conditions. They assume that this decrease in available photosynthate could become limiting for the energy production and as carbon skeletons for ammonia assimilation and therefore cause a lower N_2 fixation. However, in our experiments, sucrose only showed a significant decrease in -S 28D nodules, whereas BNF decreased in both S deficient treatments, and this decline was much more drastic than the decline in photosynthesis. Also, in experiments along several days with nodulated pea plants under oxidative stress performed by Marino et al. (2006), decrease of BNF was previous to any decrease in photosynthesis or plant growth, and it was also more pronounced. Nevertheless, a review from Schulze and Kondorosi (1998) indicates that an adequate supply of energy by photosynthesis is required for efficient nodulation, and therefore one of the causes of the lower nodule biomass, at least in -S 28D treatment, could be this decline in photosynthesis. In addition, despite this lower sucrose content, malate accumulation in -S 21D and -S 28D deficient nodules support the idea that probably bacteroid metabolism impairment is the main cause of BNF inhibition in our S-deficit experiments.

The decline in sucrose synthase activity has been revealed to be a critical regulation point for nodule metabolism, and thus BNF, as already pointed out by our group in several studies with drought-stressed nodules (Arrese-Igor et al., 2011, and references therein). Results from these studies, have lead to the assumption that inhibition of sucrose synthase is the main effect of drought, due to the subsequent decline in malate supply to the bacteroid. Also, as a result of sucrose synthase inhibition, sucrose is accumulated in drought-stressed nodules. However, this hypothesis is not valid for pasture legumes, such as alfalfa or the model legume *Medicago truncatula*. In these species, inhibition of BNF under drought stress was previous to any limitation of C flux to bacteroid, suggesting that the decrease in N_2 fixing rate would be related to an impairment of bacteroid metabolism and N fixing capacity (Naya et al., 2007; Larrainzar et al., 2009). In these cases, the microsymbiont, rather than the host plant, appears to play a crucial role in the regulation of BNF. In our

experiments, metabolic responses induced by sulphur deficiency are more similar to those induced by drought in pasture legumes. However, the differences in timing between our S-deficiency experiment (long-term) and the drought-stress experiments (short-term) described here do not allow reliable comparisons between the metabolic responses occurring in both cases. Instead, the fact that, also in our case, SuSy is the only enzyme involved in C and N metabolism, whose activity is responsive to the imposed stress in a similar way than does BNF, highlights again the crucial role of this enzyme in BNF regulation. Also, it has been demonstrated that SuSy serves as a key point in the determination of nodule sink strength, and of its potential involvement in the down-regulation of carbohydrates transport towards the nodule (González et al., 2005; Arrese-Igor et al., 2011; and references therein).

Also, it has been shown that SuSy inhibition could be mediated by a change in the redox state of thiol groups (Marino et al., 2008). They suggest that sucrose synthase activity is able to be modified by a disulphide covalent bond formation, although further studies are required to determine the potential effects of nodule S content in sucrose synthase activity and concentration.

1.6. CONCLUSIONS OF CHAPTER 1

1- S deficiency during 21 or 28 days provoked a drastic inhibition of nitrogen fixation in pea plants, along with a proportional decline in nodule biomass, but had lesser effect in photosynthesis, and no effect in plant biomass.

2- The decline in nodule content of GSH and hGSH in S limited conditions mirrored the decline in BNF, which highlights the strong correlation between the N-fixation capacity and the nodule GSH and hGSH content.

3- S limitation provoked a significant decrease in the concentration of the amino acids involved in nitrogen assimilation in nodules, probably due to the inhibition of nitrogen fixation by bacteroid and the subsequent decrease in ammonia export to host cell cytosol.

4- The increase in the content of branched-chain, aromatic and N-rich amino acids in S deficient conditions suggest an imbalance between N and S metabolism, at the whole plant level.

5- Despite the lower sucrose content found in -S21D and -S 28D nodules, malate accumulated in nodules of both treatments. We hypothesized that this accumulation might be due to impairment in bacteroid metabolism, which would be the main cause of BNF inhibition in S-limited conditions.

6- Overall, these results suggest that inhibition of BNF by S limitation during 21 days is due mainly to an imbalance in N and S metabolisms. In addition, when S deficiency was applied at an early developmental stage of nodule (-S 28D), it also provoked a drastic impairment in nodule growth and development.

CHAPTER 2

*The role of nodules in cysteine biosynthesis in pea
(Pisum sativum L.): regulation of O-acetylserine(thiol)lyase
under sulphur-limited and drought stress conditions*

2.1. INTRODUCTION

S metabolism and assimilation is a relatively little studied field in legume biology. The two main enzymes involved in the biosynthesis of cysteine, serine acetyltransferase (SAT) and O-acetylserine(thiol)lyase (OASTL), were characterized by Smith (1972) in *Phaseolus vulgaris* growing in normal and sulphur-limiting conditions. In pea, S assimilation has been localized to roots, as all of the enzymes involved in sulphate reduction to Cys have been characterized in root plastids and cytosol of pea seedlings (Brunold and Suter, 1989), and S-methylmethionine, synthesized from methionine, seems to be the predominant long-distance transport form of organic S in legumes and other plant species (Tan et al., 2010). In *Medicago truncatula*, a sulphate transporter was shown to be up-regulated in S-deficient conditions (Casieri et al., 2012; Zuber et al., 2013). Besides, the expression of two of the enzymes involved in S assimilation, adenosine 5'-phosphosulphate reductase (APR) and sulphite reductase (SiR), also increased under S-limiting conditions (Zuber et al., 2013).

Regarding OASTL, despite its important role in S assimilation and as regulator of S metabolism, there are only a few studies about its activity or characterization in legumes. Zhang et al. (2008a;b) cloned and characterized several O-acetylserine(thiol) lyase-encoding genes in *Glycine soja* and *Glycine max* (wild and domesticated soybean, respectively). In vetch (*Vicia sativa*), an OASTL gene was also cloned and characterized in leaves and roots (Novero et al., 2008), and an increase in its expression levels and activity were observed in response to sulphur deficiency (Novero and Ford, 2010). There are also few reports about this enzyme in peas: cysteine synthase (former name of OASTL) was purified from pea seedlings (Ikegami et al., 1987) and pea leaves (Ng and Anderson, 1978), but no report was found about the regulation of OASTL or cysteine synthase in peas. Interestingly, OASTL seems to be involved in the response of legumes to heavy metal stress, as both its activity and gene expression are increased in the presence of Cd, Pb or Cu in roots and shoots of *Medicago sativa*, *Lotus japonicus* and *Trifolium subterraneum* (Pajuelo et al., 2007).

As already pointed out, Larrainzar et al. (2007) detected for the first time in nodules of *Medicago* some enzymes related with S metabolism, including ATP sulphurylase, OASTL and Met synthase, suggesting that nodules are important sites for

S assimilation in legumes. However, these studies were focused in a proteomic characterization of nodules, and there is no information about the relative abundance or activity of OASTL and other enzymes in nodules, compared with those of roots or shoots.

There are few reports about the regulation of sulphur metabolism and assimilation under drought stress conditions. Larrainzar et al. (2014) showed that drought causes a downregulation of Met synthase, and other enzymes involved in the synthesis of ethylene, and Chan et al. (2012) provided a review about the role of sulphur compounds in the response of drought. Indeed, drought stress causes an imbalance in the redox status, thus influencing the levels of GSH and other related metabolites, and S assimilation and cysteine biosynthesis is known to be up-regulated in all the situations in which an oxidative stress is induced in the plant, including drought-stress. In this sense, OASTL activity and expression were shown to be up-regulated both under salt and heavy metal stress conditions in *A. thaliana* (Barroso et al., 1999; Domínguez-Solís et al., 2001), but no study was found about the involvement of OASTL in the response to drought.

2.2. OBJECTIVES

To our knowledge, there is no report about the activity or expression of OASTL in legume nodules. In order to gain further insight about the role of nodules in S assimilation and their responses to S deficiency, the activity, abundance and expression of OASTL was measured in pea nodules, roots and shoots in S-limiting conditions. Also, the involvement of OASTL in the response to drought stress has been investigated, and we also measured the activity and expression of this enzyme in mild and severe drought stress. The specific objectives addressed were as follows:

- 1) Measure and compare the levels of OASTL activity between nodules, roots and shoots of *Pisum sativum*.
- 2) Analyze the effect of S-deficiency (during 28 and 21 days) and drought-stress (mild and severe) in the regulation of the OASTL activity in roots, shoots and nodules of pea, and in bacteroids of *R. leguminosarum*, isolated from these plants.
- 3) Design specific primers to analyze the expression of the OASTL cytosolic isoform, *OASA*, in pea, based on its homology with *OASAI* sequence from *Arabidopsis*.
- 4) To gain further understanding of the regulation of the expression and protein levels of *OASA* in nodules, roots and shoots under the stress conditions detailed above.

2.3. EXPERIMENTAL PROCEDURES

Pea (*Pisum sativum* L) seedlings inoculated with *R. leguminosarum* were transferred 7 days after sowing to perlite:vermiculite pots and watered with Kalia-Drevon hydroponic solution, and S-limited treatments were applied as detailed in Material and methods (section I.4.1.2). 28 days after transplanting, the following physiological parameters were determined:

- Growth (root, shoots and nodule dry weight) (section I.5.5)
- Photosynthesis (section I.5.2)
- Nitrogen fixation (ANA) (section I.5.4)

For drought treatments, pea seedlings inoculated with *R. leguminosarum* were transferred to perlite:vermiculite pots and watered with Rigaud-Puppo solution during 4 weeks. Mild and drought stress treatments were applied as detailed in Material and methods, section. Drought-stressed plants were harvested at days 4 (mild drought) and 9 (severe drought) after the onset of drought, when leaf water potential reached values between -0.7 and -0.9 MPa in mild drought plants, and between -1.3 and -1.6 in severe drought plants. Control plants were harvested in between mild and severe drought harvesting days. The following physiological parameters were determined in all plants:

- Growth (as shoots, root and nodule dry weight) (section I.5.5)
- Leaf water potential (section I.5.1)
- Photosynthesis (section I.5.2)
- Nitrogen fixation (ANA) (section I.5.4)

On harvesting, aliquots of shoots, root and nodules from both both S-deficiency and drought experiments were collected, frozen immediately in liquid N₂ and stored at -80 °C and the following biochemical and molecular analyses were performed:

- OASTL activity (section I.8)
- Immunodetection (Western-Blot) of OASA (section I.9)
- Expression of *OASA* gene (RT-qPCR) (section I.10)
- Thiol content (total cysteine and glutathione) (section I.11)

Methods for the determination of all parameters are described in the corresponding section of Material and methods.

2.4. RESULTS

2.4.1. Growth and physiological parameters

To evaluate the physiological effects of drought and sulphur deficiency treatments, net photosynthesis and apparent nitrogenase activity were measured in both experiments. Also, leaf water potential was measured in drought-stressed plants, in order to evaluate the degree of the imposed water deficit, establishing two levels of drought according to the values of leaf Ψ_w : mild drought plants were collected when Ψ_w reached an average value of -0.74 ± 0.03 MPa, and severe drought stress corresponded to a -1.3 ± 0.06 MPa (figure 2.1). Plants reached these values at day 4 and 8-9 after the onset of drought, respectively. Values of leaf Ψ_w in control plants were -0.37 ± 0.03 MPa.

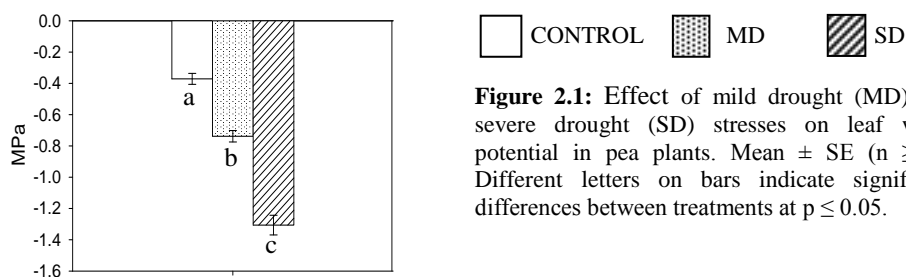


Figure 2.1: Effect of mild drought (MD) and severe drought (SD) stresses on leaf water potential in pea plants. Mean \pm SE ($n \geq 5$). Different letters on bars indicate significant differences between treatments at $p \leq 0.05$.

S deficiency during 21 and 28 days provoked a decrease in the photosynthetic rate (Figure 2.2A), but the reduction was only in 10% compared with photosynthetic rate in control plants. Nitrogen fixation, measured as ANA (Fig 1B) was more affected by sulphur deficiency, as already showed in Chapter 1, and its pattern of decrease was similar to nodule biomass, for both -S 21D and -S 28D treatments: 60% for -S28D plants, and 30% for -S 21D plants (figure 2.2B).

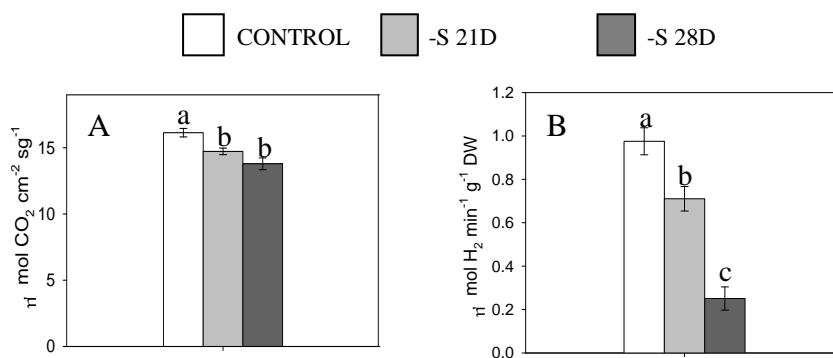


Figure 2.2: Effect of S-deficiency during 21 days (-S 21D) and 28 days (-S 28D) on photosynthesis (A) and apparent nitrogenase activity (B) in pea plants. Mean \pm SE (n = 9). Different letters on bars indicate significant differences between treatments at $p \leq 0.05$.

Photosynthesis was also affected by drought stress, and the reduction was more pronounced (50%) in plants subjected to water restriction during 8 days (severe drought) (figure 2.3A). Water restriction also provoked a drastic decline in nitrogen fixation, expressed by nodule dry weight as ANA values dropped about 33% in mild drought plants, and more than 66% in plants subjected to a severe drought (figure 2.3B).

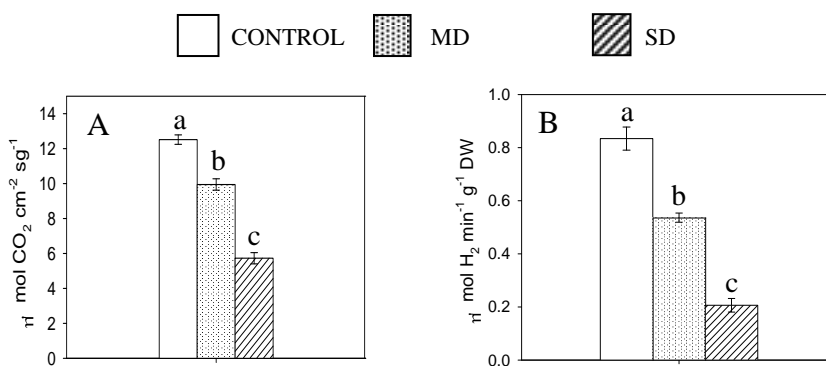


Figure 2.3: Effect of mild drought (MD) and severe drought (SD) stresses on photosynthesis (A) and apparent nitrogenase activity (B) in pea plants. Mean \pm SE (n = 9). Different letters on bars indicate significant differences between treatments at $p \leq 0.05$.

Shoot and root growth, expressed as dry weight, showed a significant decrease after 28 days in S-limited conditions, and S limitation during 21 days also affected shoot growth (figure 2.2A). Meanwhile, nodule dry weight in -S 28D plants experienced nearly a 50 % reduction compared with control plants, while nodule biomass decline in -S 21D plants was about 33% (Figure 2.2B).

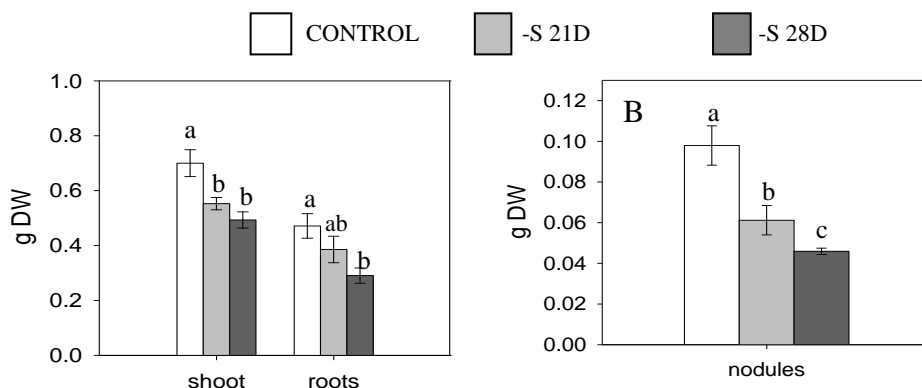


Figure 2.4: Shoot, root (A) and nodule biomass (B) in control, -S 21D and -S 28D plants after 4 weeks of growth. Mean \pm SE (n = 9). Different letters on bars indicate significant differences between treatments at $p \leq 0.05$.

In contrast, drought treatments did not provoke any effect neither on shoot nor root biomass as dry weight (figure 2.2A), although nodule growth was impaired in both mild and severe drought treatments, showing a reduction of c.a. 20% compared with control dry weight (figure 2.5B).

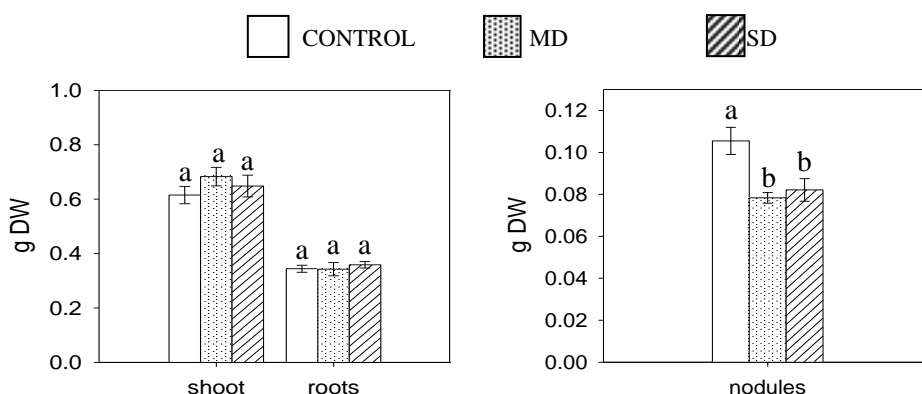


Figure 2.5: Shoot, root (A) and nodule biomass (B) in control, mild drought (MD) and severe drought (SD) plants. Mean \pm SE (n = 9). Different letters on bars indicate significant differences between treatments at $p \leq 0.05$.

2.4.2. OASTL activity

In order to determine the contribution of the different tissues of nodulated pea plants in the cysteine biosynthesis, the OASTL activity level has been analyzed in shoots, roots and nodules. Giving the lack of information about this enzyme in nodules, optimizations of the enzymatic assay including volume and concentration of protein extract were carried out prior to the measurement of activity. OASTL activity was

measured as cysteine production after 10 min of incubation and values were normalized in all samples against their respective protein content. Cysteine production was quantified in a spectrophotometer after incubation with the ninhydrin reagent in acidic conditions, which gives a coloured reactive, whose colour intensity is related with cysteine concentration in the sample. The highest specific activity (defined as U enzyme/mg protein) was detected in nodules, for all treatments, and in both S-deficiency and drought experiments. OASTL activity values in nodules were about twice the values analyzed in roots and more than 6-fold compared with the activity in shoots. In isolated bacteroids, OASTL activity was in general relatively low, representing 10% of OASTL activity in plant fraction for all treatments, and in plants from both sulphur deficiency and drought stress experiments (figures 2.6 and 2.7).

Regarding the effect of stresses in the level of activity, sulphur deficiency provoked a significant increase of OASTL activity in roots, for both S-deprived treatments, compared with control plants (figure 2.6A). In shoots, S deficiency also induced an increase in OASTL activity, although this increase was significant only in the treatment of -S 28D, being 2-fold compared with the level of activity in control shoots (figure 2.6A).

In contrast, S limitation for 28 days induced a down-regulation in OASTL activity in nodules, in which activity decreased about 50% compared with activity in control nodules, both in plant and bacteroid fractions (figure 2.6B). Levels of activity in -S 21D nodule plant fraction and bacteroids were similar to control values (figure 2.6B).

Meanwhile, drought induced a decrease in the activity both in shoots and roots, but the decrease was only significant in severe drought conditions (figure 2.7A). In drought-stressed nodules, the regulation of OASTL showed a similar pattern that the described above for S-limited conditions: a significant decrease of about 40% was observed in severe drought conditions both in plant and bacteroid fractions, whereas OASTL activity in mild drought treated nodules remain almost unchanged compared with control values (figure 2.7B).

Differences between levels of activity in control plants of S-limited and control plants of drought experiment can be explained by the nutrient solution used in each

experiment: all the mineral elements, including sulphur, are in higher concentration in Kalia-Drevon solution used in S-limiting experiment than in the Rigaud-Puppo used in the drought experiment.

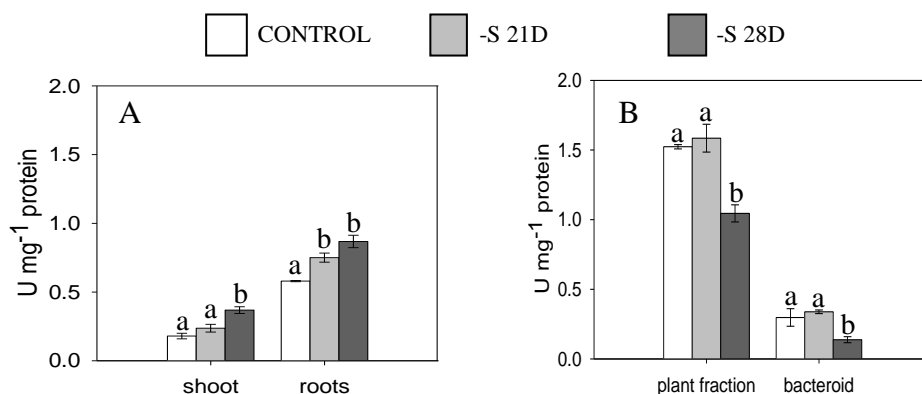


Figure 2.6: Effect of S-deficiency during 21 days (-S 21D) and 28 days (-S 28D) on OASTL activity in shoot, roots (A) and in nodule plant fraction and bacteroids (B) of pea plants. Specific enzymatic activity (U/mg protein) was calculated as μmol of cysteine produced in 10 min of enzymatic reaction per mg of protein in the tissue assayed in each case. Values represent average \pm SE ($n \geq 12$; at least 4 biological replicates, measured in triplicate). Different letters within the same group of bars (each tissue) indicate significant differences between treatments at p value ≤ 0.05 .

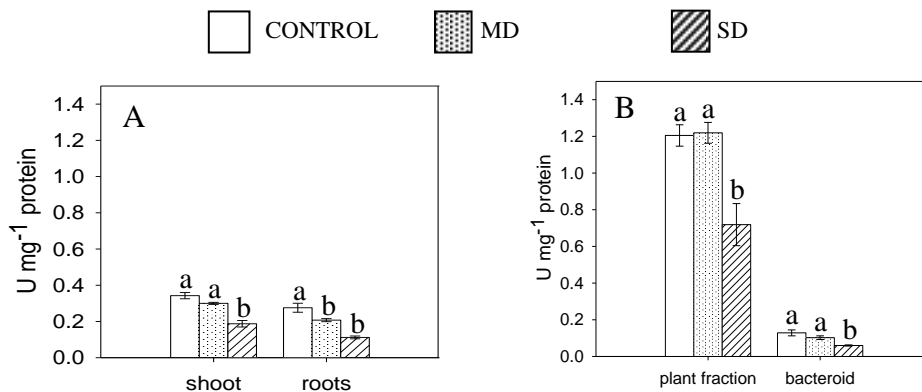


Figure 2.7: Effect of mild drought (MD) and severe drought (SD) stresses on OASTL activity in shoot, roots (A) and in the nodule plant fraction and bacteroids (B) of pea plants. Specific enzymatic activity (U/mg protein) was calculated as μmol of cysteine produced in 10 min of enzymatic reaction per mg of protein in the tissue assayed in each case. Values represent average \pm SE ($n \geq 12$; at least 4 biological replicates, measured in triplicate). Different letters within the same group of bars (each tissue) indicate significant differences between treatments at p value ≤ 0.05 .

2.4.3. Immunodetection of OASA (Western-blot analysis)

Complementary to the enzymatic assay, the effect of S-deficiency and drought on OASTL protein levels was studied by Western-blot analysis. First, optimisation of the immunodetection conditions including antibody dilutions and protein concentration was carried out. For immunodetection of OASTL isoforms in pea, an antibody designed for the cytosolic isoform of Arabidopsis (anti-OASA1), kindly provided by R. Hell (Heidelberg, Germany), was used; this antibody crossreacted preferentially with pea OASA1 in all tissues, but also showed a weaker crossreaction with OASC mitochondrial isoform in all tissues, and, in shoots, also with the chloroplastic isoform (OASB).

S limitation for 28 days provoked a drastic increase (about 4-fold) in the levels of OASA in shoots (figure 2.8A). In roots, OASA protein levels showed a trend to increase after 21 days of S deficiency, yet not significant. In contrast, a longer period of S limitation (28 days) provoked the opposite effect in roots, since OASA levels decreased significantly (figure 2.8B). Also, protein abundance of the cytosolic OASTL in nodules decreased about 2-fold after 28 days of S deficiency (figure 2.8C).

Meanwhile, the major effect of water restriction in protein abundance of OASA was found in nodules, in which a significant reduction was shown, both for mild and severe drought. Levels of OASA in drought-stressed roots also showed a trend to decline, although it was not significant (figure 2.9).

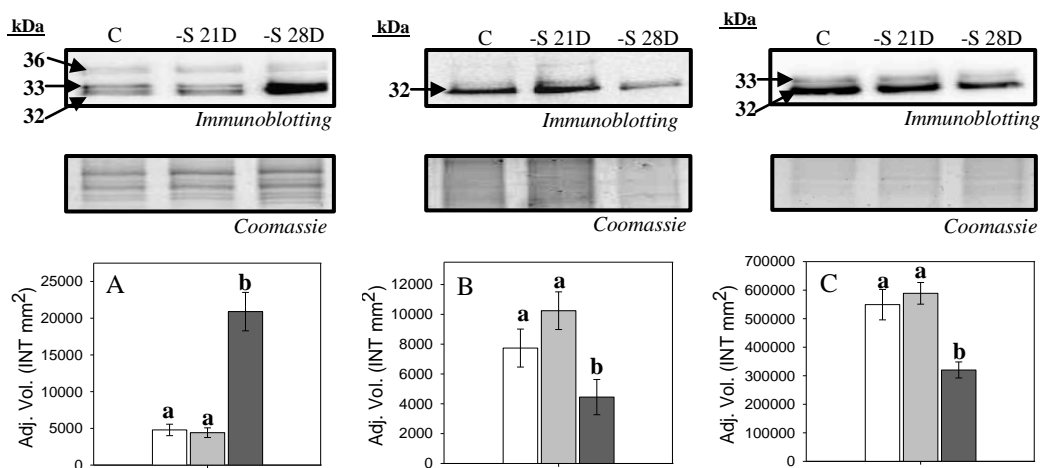


Figure 2.8: Effect of S-deficiency during 21 (-S 21D) and 28 days (-S 28D) in the protein abundance of major isoforms of OASTL in shoots (A), roots (B) and nodules (C) of pea plants. A total of 5 μ g of protein was loaded into each lane. The Coomassie-stained gels on the bottom, with the total amount of input proteins, are shown as loading controls. The signals corresponding to the OASTL cytosolic isoform (32 kDa band) were quantified using a densitometer and quantification of each sample was normalized against quantification of the total amount of loaded protein in each sample, in the corresponding lane in the Coomassie-stained gel. The immunodetected bands of 36 and 33 kDa should correspond to the crossreaction with the plastidic and mitochondrial OASTL isoforms. Results of the normalized quantification (as adjusted volume) are shown in the bar graph on the bottom. Data are mean ($n \geq 2$) \pm SE. Different letters on bars indicate significant differences at p value ≤ 5 , using Student's t -test. Legend as in figure 2.6.

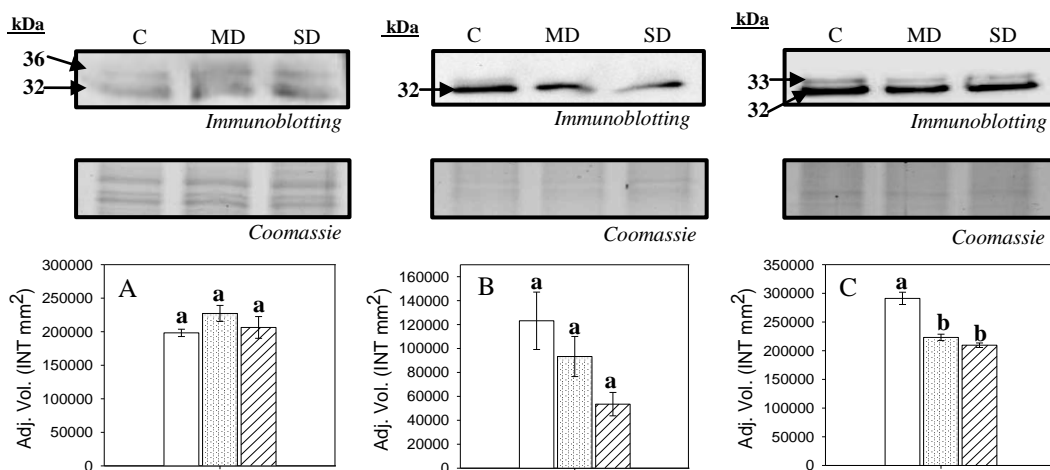


Figure 2.9: Effect of mild and severe drought stress (MD and SD, respectively) in the protein abundance of the major isoforms of OASTL in shoots, roots and nodule of pea plants. A total of 5 μ g of protein was loaded into each well. The Coomassie-stained gel on the bottom, with the total amount of input proteins, is shown as loading controls. The signals corresponding to the OASTL cytosolic isoform (32 kDa band) were quantified using a densitometer and quantification of each sample was normalized against quantification of the total amount of loaded protein in each sample, in the corresponding lane in the Coomassie-stained gel. The immunodetected bands of 36 and 33 kDa should correspond to the crossreaction with the plastidic and mitochondrial OASTL isoforms. Results of the normalized quantification (as adjusted volume) are shown in the bar graph on the right. Statistics as in figure 2.8. Legend as in figure 2.7.

2.4.4. Expression of *OASA* gene (RT-qPCR)

In order to establish if the activity of OASTL enzyme in S-limited and drought stressed peas is related with its gene expression, the relative transcript abundance of the major OASTL isoform (the cytosolic *OASA*) was analyzed by quantitative PCR (RT-qPCR). *OASA* was amplified using the oligonucleotides designed for pea *OASA*, whose sequence is based in the sequence with the highest homology to the Arabidopsis *OASA1* and the longest *UTR* (untranscribed region), according to the database http://www.coolseasonfoodlegume.org/P_sativum, using the software Vector NTI for primers design. The sequence chosen, with the code: p_sativum_wa1_contig21558m had a length of 1479 pb, and its predicted peptide sequence showed a 70.70% homology with the *OASA1* peptide sequence of Arabidopsis, according with the TAIR database (<http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=128864&type=locus>)

The highest relative expression of *OASA* in peas was found in nodules, both for S-deficiency and drought stress experiments (figures 2.10A and 2.10C). In plants subjected to S-deficiency, the level of *OASA* expression was induced in shoots and roots by 21 days and 28 days limitation, but this increase was significant only for shoots, in which the level of expression in the –S 21D treatment seems to be ca. 3-fold higher than the control values, and showed also higher values than in shoots subjected to the longest period of S-limitation tested (-S 28D). In contrast, *OASA* expression in nodules was not affected by S-deprivation.

Meanwhile, only a severe drought stress caused a decrease in the expression of *OASA* in all tissues analyzed (shoots, roots and nodules), being 2-fold decreased compared with control plants in all tissues, whereas mild drought did not appear to affect *OASA* expression in any case.

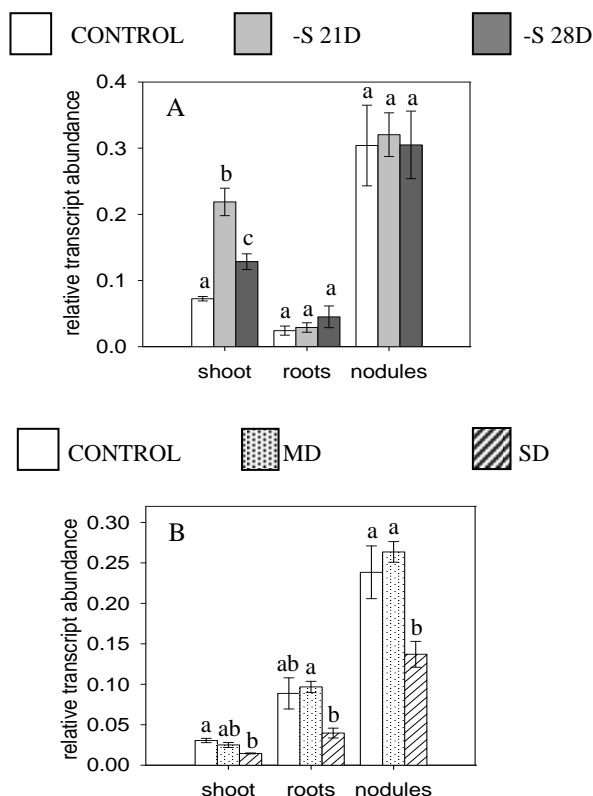


Figure 2.10: Gene expression analysis of *OASA* in shoot, roots and nodules (plant fraction) of pea plants subjected to S-deficiency (A) and drought (C) stresses. Values represent relative expression levels respect to those of the housekeeping gene used for reference (1-alpha elongation factor), according to the $2^{-\Delta C_t}$ method. Expression levels of the housekeeping gene in S-limited (B) and drought-stressed (D) plants are also shown. Values represent average \pm SE (n=9; 3 biological samples measured in triplicate). Different letters within the same group of bars (each tissue) indicate significant differences between treatments at p value ≤ 0.05 .

2.4.5. Thiol content

Thiol content, as the total pool of oxidised and reduced forms of cysteine or glutathione, was expressed as nmol cysteine and μ mol glutathione per dry weight. Nodules showed the highest concentration of glutathione, in plants from both drought and S-deficiency treatments. A long-term S deficiency (during 28 days) produced a significant decline in cysteine and glutathione content, in all tissues (figure 2.11). This decrease was much more pronounced for glutathione, especially in shoots, for which a decay of 90% in glutathione content was observed, compared with control values. In – S 28D roots this decline was about 10-fold, whereas in nodules glutathione content diminished only 2-fold in –S 28D plants (figure 2.11A). S deficiency during 28 days

also provoked a decrease in cysteine content in all tissues, being this decay more pronounced in shoot and roots (ca. 50%) than in nodules (figure 2.11B)

The effect of water deprivation in thiol content showed a variable pattern, mainly in total glutathione content since it decreased in shoots after mild and severe drought stress, but it increased in both mild and severe drought-stressed roots and nodules (figure 2.12A). Meanwhile, the general response to drought stress was an increase in cysteine content. A severe drought stress provoked a significant increase in cysteine concentration of all tissues, whereas mild drought stress only appeared to cause increased total cysteine content in root and nodules (figure 2.12B).

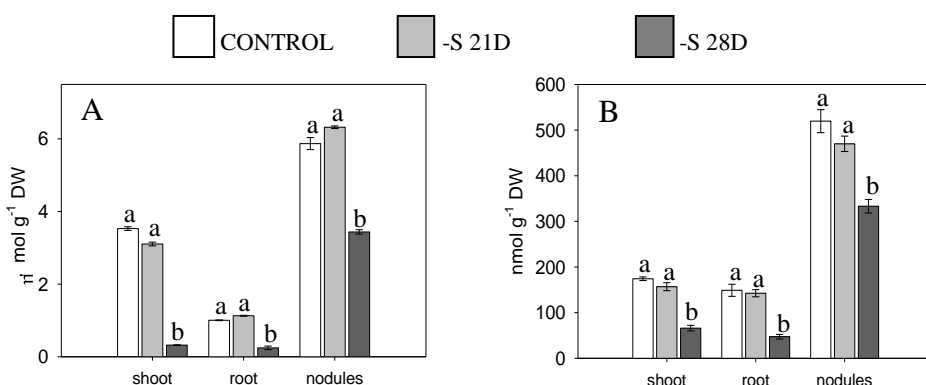


Figure 2.11: total glutathione (A) and cysteine (B) content in shoot, roots and nodules (plant fraction) of pea plants subjected to S-deficiency during 21 and 28 days. Values represent average \pm SE ($n \geq 6$; at least 3 biological samples plus 2 technical replicates). Different letters within the same group of bars (each tissue) indicate significant differences between treatments at p value ≤ 0.05 .

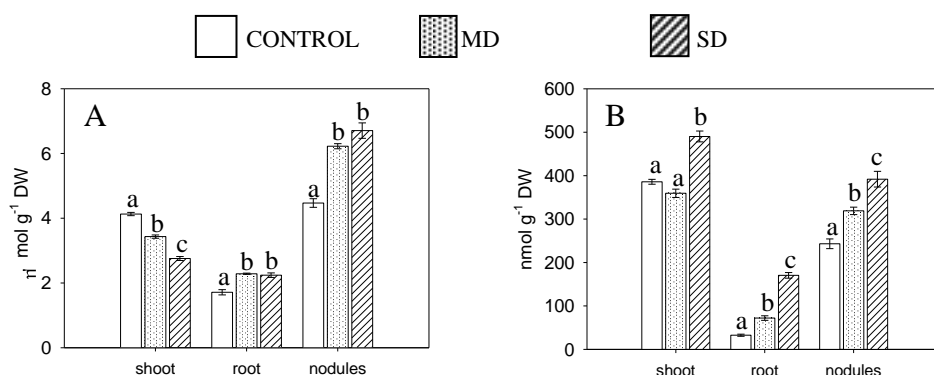


Figure 2.12: total glutathione (A) and cysteine (B) content in shoot, roots and nodules (plant fraction) of pea plants subjected to mild and severe drought stress. Values and represent average \pm SE ($n \geq 6$; at least 3 biological samples plus 2 technical replicates). Different letters within the same group of bars (each tissue) indicate significant differences between treatments at p value ≤ 0.05 .

2.5. DISCUSSION

Cysteine is the first molecule in plant metabolism containing both sulphur and nitrogen, so the regulation of its biosynthesis is critically important for the plant (Hesse et al., 2004). Cysteine is further used for protein synthesis and as a source of reduced sulphur for other S-containing compounds essential for plant growth and survival (Kopriva and Rennenberg, 2004), and is also a precursor for the biosynthesis of several plant defence compounds, such as glutathione (Rausch and Watcher, 2005). The enzymes O-acetylserine(thiol)lyase and serine acetyltransferase constitute the central point in the regulation of cysteine biosynthesis; both enzymes bind forming the enzymatic complex cysteine synthase, and the formation and dissociation of this complex is responsible for the activation or inhibition of its two forming enzymes (Wirtz and Hell, 2006). The association of SAT with OASTL is controlled, amongst other factors, by cysteine and inorganic sulphur.

In recent years, several OASTL isoforms have been purified and characterized in several plant species, especially in the model plant *A. thaliana*, allowing the identification and isolation of 9 isoforms of OASTL, located in three different cellular compartments: cytosol, chloroplast/plastid and mitochondria (Jost et al., 2000; Wirtz et al., 2004; Takahashi et al., 2011). Also, according to the database Phytozome V9.1 (www.phytozome.org), characterization of OASTL in the leguminous plants *M. truncatula* and in soybean (*G. max*) allowed for the identification of 14 orthologs in soybean and 18 in the model legume *M. truncatula* (Romero et al., 2014). The cytosol is considered the major site of cysteine synthesis (Haas et al., 2008). Krueger et al. (2009) demonstrated in *A. thaliana* that Cys concentrations in the cytosol are higher than in other compartments. Thus, they estimated that cytosolic cysteine levels in Arabidopsis are over 300 μM , whereas the other cell compartments contain below 10 μM . As a consequence, Cys homeostasis in the cell is tightly controlled in the cytosol.

The classical view of sulphur assimilation is that sulphate is taken by the roots and translocated to photosynthetic tissues, where S assimilation and cysteine biosynthesis takes place, thanks to the energy coming from photosynthesis (Lunn et al., 1990; Nikiforova et al., 2005). However, a number of publications suggest that roots and other non-green tissues are also able to reduce sulphate and incorporate it into

sulphur amino acids (Brunold and Suter, 1987; Barroso et al., 1998; Phartiyal et al., 2006). Legume nodules have been shown to be important sites for sulphur assimilation, as some enzymes of this pathway, including OASTL, methionine synthase and APS reductase, have been identified in a proteomic study (Larrainzar et al., 2007). However, to our knowledge, no report was found about the activity or gene expression of this enzyme in nodules. In this work, the participation of the different tissues of nodulated pea plants in the cysteine biosynthesis has been characterized, by estimation of OASTL activity, protein abundance and gene expression level. Interestingly, our results show that nodules contribute significantly to the general pool of cysteine in nodulated plants, at least in pea, since nodules showed the highest level of OASTL activity and expression.

Sulphur uptake and assimilation pathways in photosynthetic organisms are regulated at different key points and by several factors, especially by sulphur availability in the environment and sulphur demand by the plant (Takahashi et al., 2011). However, apart from S deficiency, S metabolism has been reported to be altered by other abiotic stresses on different levels. For example, the expression of OASTL has been reported to be upregulated both under salt and heavy metal stress in *A. thaliana* (Barroso et al., 1999; Domínguez-Solís et al., 2001) and also in several crop legumes, in the presence of heavy metals (Pajuelo et al., 2007). In this work, the effect of two environmental stresses, drought and sulphur deficiency in the regulation of OASTL activity, protein levels and gene expression was studied in pea shoots, roots and nodules. Sulphur assimilation is strictly regulated by the sulphur status of the plant, due to the existence of toxic intermediates in the pathway (Brunold 1990; Leustek et al., 2000): is repressed when reduced sulphur or thiols are available, and it is promptly activated by sulphur limitation or by an enhanced sulphur demand for growth and development (Carfagna et al., 2011; Kopriva and Rennenberg, 2004). OASTL activity is usually enhanced by sulphur limitation, although it was also reported either to be reduced by sulphur deficiency (Warrilow and Hawkesford, 1998) or not to be affected (Smith, 1980; Takahashi and Saito, 1996). Our results show that OASTL activity is induced both in shoots and roots of pea plants subjected to S limitation during 21 and 28 days. In contrast, it was repressed in nodules, but only when plants were S-deprived

during 28 days, whereas OASTL activity in –S 21D nodules was not affected. This opens up the possibility of different regulatory mechanisms existing in pea nodules for OASTL, as a response to S limitation. According to Barroso et al. (1995), the effect of S starvation on the OASTL activity in *Arabidopsis* was dependent on the tissue analyzed: it caused an increase of up to twice the level of activity in stems, rosettes and cauline leaves of S sufficient plants, whereas OASTL activity in flowers was not affected by S deficiency. In spinach leaves, OASTL activity was also reported to decrease under S-limitation, whereas it increased slightly in roots, in the same experiment (Warrilow and Hawkesford, 1998). These authors suggested that the observed decrease in cysteine synthase is a consequence of a cessation in chloroplast biosynthesis induced by S-starvation, giving the reported decrease in the abundance of the chloroplastic OASTL isoform (Warrilow and Hawkesford, 1998). Also, OASTL activity was unaffected by S-deficiency neither in shoots nor in roots of wheat (Ciaffi et al., 2013). Therefore, the response of this activity to S availability seems to be dependent on the plant species and the tissue. We speculate that the decrease of OASTL in –S28D nodules could be a consequence of the impaired nodule development, caused by the depletion of S during the early stages of the symbiosis, as already discussed in Chapter 1 of the present work.

OASTL activity was also measured in isolated bacteroids, representing less than 10% of total OASTL activity found in nodules. OASTL was characterized in several bacterial species and microorganism, including *E. coli* (Kredich, 1993), and the photosynthetic microalgae *Chlorella sorokiana* (Carfagna et al., 2011) and *Chlamydomonas reinhardtii* (Ravina et al., 1999). However, no reports about this enzyme in *Rhizobiaceae* were found, although some of the enzymes of the cysteine biosynthetic pathway have been characterized or analyzed in several rhizobia species, including sulphite reductase and methionine synthase in *R. etli* (Taté et al., 1997;1999) and serine acetyltransferase in *R. leguminosarum* (Parker et al., 2001). Therefore, free-living rhizobia are able to assimilate sulphate and synthesize cysteine, but in their process of differentiation to bacteroids, rhizobia lose several features and enzymes needed for survival in the rhizosphere (Karunakaran et al., 2009), including those for the assimilation of sulphur and other nutrients, becoming dependent on their legume

host for the provision of nutrients (Udvardi and Poole, 2013). Nevertheless, our results suggest that bacteroids retain the ability to assimilate sulphur in the form of sulphate, and synthesize cysteine through OASTL activity, although they are able to use other sulphur sources provided by the host, as will be further discussed in detail in Chapter 3 of the present work.

In order to know if the regulation of OASTL activity under drought stress or sulphur limitation is correlated with the physiological status in nodulated peas, growth parameters, nitrogen fixation and photosynthesis were measured in pea plants subjected to these stresses. Sulphur limitation during 28 days caused a significant inhibition of growth in all plant tissues (shoot, root and nodules). When plants were S deprived for 21 days, only root and nodule growth was affected. In case of nodules, the degree of growth inhibition was correlated with the inhibition pattern observed for nitrogen fixation in both S-limited treatments, as already observed in Chapter 1 of the present work, for S-limited plants growth in pure hydroponic culture. Also, in agreement with the results presented in Chapter 1, the inhibition of photosynthesis caused by S-limitation during 21 and 28 days was less pronounced than the inhibition of BNF in these conditions. Furthermore, S deficiency inhibited nodule growth in a higher extent than shoots and root growth, suggesting that NF and traits associated are more sensitive to S deficiency than those associated with host plants, such as plant growth or photosynthesis, as suggested by Varin et al. (2010) and in Chapter 1 of the present work.

A similar pattern was observed for BNF and photosynthesis response to drought stress; BNF was inhibited by drought stress to a higher extent than photosynthesis. Also, neither shoot nor root growth was affected by water restriction, whereas nodule biomass decreased significantly under mild and severe drought stress. The classical view of the inhibition of BNF by drought has been ascribed to a lack of carbohydrate supply to the nodules, resulting from a reduction in shoot photosynthesis (Huang et al., 1975). This seems to be evident when plants are exposed to a long-term water deficit, but it has been shown that BNF is more sensitive than photosynthesis to moderate water deprivation (Durand et al., 1987; Djekoun and Planchon 1991; Arrese-Igor et al., 2011).

It is well known that symbiotic nitrogen fixation is rapidly inhibited by drought stress. Nodule carbon and nitrogen metabolisms have been studied widely, and nowadays it seems clear that a strong relationship exist between the decline in nitrogen fixation and the inhibition of several enzymes of these pathways, especially sucrose synthase (Arrese-Igor et al., 2011; and references therein). The involvement of sulphur metabolism in the response of drought remains still to be characterized, although it seems that drought exerts an imbalance in methionine and ethylene biosynthesis in *Medicago truncatula* nodules (Larrainzar et al., 2014). In a proteomic study in pea nodules, the enzyme S-adenosylmethionine transferase, which is in charge of the synthesis of the methyl-group donor S-adenosylmethionine, has been found to be down-regulated by drought in the nodule plant partner (Irar et al., 2014). Our results show that, after a long period of water deprivation (severe drought), there is a strong inhibition of nitrogen fixation, and also a significant decay in OASTL activity in nodules, whereas mild drought only seems to inhibit OASTL activity in roots.

Different regulatory mechanisms of sulphur metabolism have been recently described in plants, such as transcriptional, post-transcriptional, protein-protein interaction and feed-back control (Davidian and Kopriva, 2010; Yi et al., 2010). Sulphate assimilation has been proposed to be extensively regulated by abiotic stress at the post-transcriptional level acting on plant adenosine 5'-phosphosulohate reductase (APR) through a complex network of multiple signals (Koprivova et al., 2008). However, besides transcriptional control of OASTL genes and interaction with SAT, there are just a few reports about other levels of regulation for OASTL function. Recently, Álvarez et al. (2010) proposed the nitration of tyrosine residues as a post-translational modification of OASTL protein which modulates its function. Abiotic stresses lead often to the production of reactive oxygen and nitrogen species that might modulate the activity and structure of the enzymes. In order to know if the regulation of OASTL activity in S-limited and drought stress conditions is related with protein levels, protein abundance of OASTL was measured by Western-Blot, using as a probe an antibody obtained against the most abundant cytosolic OASTL isoenzyme from *Arabidopsis thaliana* (OASA1, Barroso et al., 1995). In a previous work, anti-OASA1 from *A. thaliana* was able to cross-react and recognize up to three OASTL isoforms,

including the cytosolic isoform, in the crop legumes *Lotus japonicum* and *Trifolium subterraneum* (Pajuelo et al., 2007). Also, the sequence analysis of OASTL from *T. subterraneum* in the same work revealed that OASTL partial peptide sequence has a very high identity (more than 90%) with OASTL sequence from other legumes, including *M. truncatula*, *G. max* and *C. arietinum* (Pajuelo et al., 2007). Giving the high sequence homology of OASTL between legumes, the same antibody against *A. thaliana* cytosolic OASA1 was used for pea in this work. This antibody was able to recognize preferentially at least one cytosolic isoform in pea, in all tissues analyzed, showing a 31-33 kDa band in the Immunoblot gel. This allowed us to quantify and compare pea cytosolic OASA abundance between treatments. Incubation of the blot with Arabidopsis anti-OASA1 also showed a weaker signal corresponding with a mitochondrial isoform (OASC), and a chloroplastic/plastidic isoform (OASB).

In order to correlate the level of OASTL activity with the protein OASTL abundance, we have to consider that the measured OASTL activity represents the total of these three isoforms. In Arabidopsis, about 70% of the OASTL activity corresponds to the cytosolic isoform. In our experiments, quantification of the western-blot bands corresponding to the cytosolic isoform in pea showed a drastic induction of OASA in shoots as a response to S limitation during 28 days, which is not correlated with the level of increase in OASTL activity. This difference between the level of protein and its enzymatic activity could be explained by a post-translational modification of the OASA protein. Álvarez et al. (2011) showed that nitration of the tyrosine residues in the peptidic sequence of OASA1 protein in Arabidopsis led to a decrease of 90% in OASTL activity, providing the first evidence for post-translational modulation of this enzyme. Interestingly, APR and ATPS, two enzymes of the S assimilation pathway, are regulated at the post-translational level through a complex network of multiple signals (Davidian and Kopriva, 2010). In our case, it is possible that the regulation of OASTL in S limited conditions take place also at the post-translational level, and therefore the level of induction of the protein is much more pronounced than the increase of OASTL activity in –S28D shoots. Another possibility is that S-limitation provoke different responses in the different isoforms, and therefore the high level of

induction of the cytosolic isoform would be compensated by the other isoforms, giving that OASTL activity represents the activity of the total pool of OASTL isoforms.

In roots, regulation of the OASA protein synthesis by the sulphur availability seem to be opposite to the regulatory mechanism of enzymatic activity, since an increase of activity after 28 days of S deprivation was observed, whereas protein abundance decreased. One possibility is that, in pea roots, the mitochondrial and/or the plastidic OASTL isoforms may be responsible for the induction of OASTL activity observed in S-limited roots. Takahashi et al. (1997) showed that different isoforms of the enzyme SAT (serine acetyltransferase) are differently regulated as a response to sulphur deprivation. As the incubation with the anti-OASA1 antibody only allowed quantification of the cytosolic isoform, differential induction of these other isoforms in S-limited roots remains being an open question.

Interestingly, regulation of the OASTL activity by S limitation in nodules does correlate with the protein levels of the cytosolic isoform, since a decrease in protein abundance was observed for nodules subjected to S deficiency during 28 days, but no change was observed for –S 21D nodules. OASA protein abundance was also affected by both mild and severe drought stress. This confirms that the different responses of the enzyme to S limited conditions in nodules are also regulated at the protein level, and also that OASTL activity in nodules is mainly associated with the cytosolic isoform in peas.

Despite this correlation between OASTL activity and protein abundance and enzyme activity, gene expression of *OASA* gene in nodules was not affected by S-limited conditions, suggesting that regulation of this enzyme in S-limited conditions in nodules is made mainly at the level of activity and protein abundance. In contrast, it was enhanced in S-limited shoots and roots, which mirrored the response of enzymatic activity in these tissues. A general down-regulation of the expression of *OASA* gene as a response to severe drought stress was observed in all tissues, which was also correlated with the inhibition of enzymatic activity.

The OASTL enzyme leads to the synthesis of cysteine, which is further used to produce glutathione. Thus, it is not surprising that the highest levels of these thiols were found in nodules, especially for glutathione, for both experiments. This high

content in glutathione in legume nodules, already pointed out in Chapter 1 of the present work, and by a number of works and reviews (Larrainzar et al., 2014; Frendo et al., 1999; and references therein), has led to the general idea that the role of glutathione and other thiols is to protect against toxic oxygen species coming from the process of nitrogen fixation (Matamoros et al., 1999a) and environmental stresses. Both cysteine and glutathione content decreased significantly in all tissues after 28 days of S limitation. In –S 28D shoots, the decay in glutathione content was c.a. 90%, whereas in nodules, it only decreased to 50% the values in control plants. This highlights the important role of glutathione for effective symbiosis and nitrogen fixation, already discussed in several works (Frendo et al., 1999; Moran et al., 2000; Matamoros et al., 1999b). It has been established that symbiotic proficiency of rhizobia species depends on their capacity to synthesize GSH (Pauly et al., 2006), and also that the disruption of its biosynthetic pathway either from the plant side or from the bacteroid has been shown to lead to impaired SNF (Harrison et al., 2005; Muglia et al., 2008) and even inhibition of nodule formation (Frendo, et al., 2005). We hypothesized that, in S-limited conditions, the reserves of glutathione in shoots are remobilized towards the nodules, in order to maintain its functionality. Interestingly, the levels of cysteine diminished in all tissues after 28 days of S limitation, but this decrease was less pronounced than that showed for glutathione. This is in agreement with the role of glutathione as storage of reduced S and serving as a reserve of cysteine (Kopriva and Rennenberg, 2004): to compensate for the long-term S limitation, glutathione would be degraded into cysteine in –S 28D plants, in order to provide enough cysteine levels for protein synthesis and other essential plant functions, as already proposed by Carfagna et al. (2011) for S-deprived barley. Also, it should be noted that S limitation during 21 days did not cause any effect on the levels of thiols, which is in apparent contradiction with the results showed in Chapter 1. However, these differences can be explained by the analytical method used in each case and also by the growth conditions of the plants.

Drought stress had the opposite effect in the levels of thiols, since there was a general increase of both glutathione and cysteine for all tissues, with the exception of shoots, in which glutathione content decreased in mild and severe drought stressed plants. Increases of glutathione content in plants exposed to drought stress and other

abiotic stresses have been widely reported, since the oxidative stress caused by these constraints lead to an increase in the enzymatic and non-enzymatic systems associated with ROS scavenging (Okpodu et al., 1996; Apel and Hirt, 2004; Marino et al., 2006). According to a recent review, sulphur metabolism play significant roles in drought stress signalling and response, as the synthesis of several sulphur-containing metabolites, such as glutathione, is induced as a response to drought and other environmental stresses (Chan et al., 2013). Glutathione synthesis increase in plants exposed to xenobiotic or abiotic stresses, as seen in nodules of soybean (Dalton, 1992) or pea (Marino et al., 2006) exposed to the herbicide paraquat, and also in salt-stressed *Brassica napus* plants (Ruiz and Blumwald, 2002). The latter attributed the increase in glutathione synthesis to an enhancement of S assimilation and cysteine biosynthesis under salt stress conditions. This hypothesis cannot be applied to our results, since OASTL activity, the main enzyme involved in cysteine biosynthesis, decreased under drought stress in all tissues. Instead, it is possible that cysteine accumulation occurs concomitantly with a general accumulation of amino acids occurring in legumes subjected to drought stress (Gil-Quintana et al., 2013a;b), or other constraints such as exposure to herbicides (Zulet et al., 2013).

In conclusion, giving the high levels of OASTL activity and expression in nodules, our results highlight the importance, so far overlooked, of legume nodules in S assimilation. Also, its regulation pattern in nodules under S deficiency and drought stress conditions opens up further studies on the functional characterization and the role of this enzyme and other enzymes of S metabolism in N fixing nodules.

2.6. CONCLUSIONS OF CHAPTER 2

1- In this work, detection and measurement of OASTL activity was performed in pea nodules, which showed the highest level of activity of the plant, providing the first report of this enzymatic activity in legume nodules, and highlighting the importance of nodules in S assimilation.

2- OASTL activity was enhanced by S deficiency for 21 and 28 days in pea shoots and roots, which is in agreement to the general response of OASTL to S limitation. In contrast, the decrease of this enzyme in –S 28D nodules and in bacteroids isolated from these nodules suggests that the regulation of this enzyme by S availability follow a different pattern in nodules. The decrease in the protein levels of the cytosolic isoform OASA in nodules under S limitation support this hypothesis.

3- Drought stress exerted a general inhibition in OASTL in all tissues. A severe drought stress provoked a decrease in the activity and gene expression levels of OASTL in shoots, roots and nodules, and also lower protein abundance in nodules. In peas subjected to mild drought, only the protein levels in nodules seemed to be affected.

4- The decay in thiol (glutathione and cysteine) content in nodules of S-limited plants mirrored the decline in nitrogen fixation in these plants, highlighting the important role of these compounds for effective symbiosis and nitrogen fixation. The strong decrease in shoot glutathione content in –S 28D plants, along with the high levels of thiols found in nodules in all treatments suggest a remobilization of GSH from shoots to nodules, in order to maintain its functionality.

5- The general increase of thiols in all tissues as a response to water restriction is in accordance to the role of these compounds, especially GSH, in the plant defence against ROS produced by drought and other abiotic stresses.

CHAPTER 3

*A cysH mutant strain of Rhizobium leguminosarum
RL3841 defective in sulphate assimilation: analysis of
auxotrophy for sulphur compounds in free-living and
symbiotic conditions*

3.1 INTRODUCTION

During the differentiation of rizobia into bacteroids in the nodulation process, they lose some of their features, such as the ability to assimilate certain nutrients. Therefore, in these symbioses, the plan should ensure the optimal provision of nutrients, including carbon, nitrogen, phosphorous and sulphur sources to support the growth of developing nodules.

The exchange of sulphur between the plant and the bacteroids is essential for their function, as evident from the loss of nitrogen fixation capacity in a *Lotus japonicus* mutant in a symbiosome located sulphate transporter SST1 (Krusell et al., 2005). However, sulphur metabolism in nodule bacteroids and free-living rhizobia has not been studied in depth. Sulphur is essential for life in all organisms, as constituent of the amino acids cysteine and methionine and many cofactors and prosthetic groups. Species belonging to the *Rhizobiaceae* family require sulphur in addition for molecules related with their symbiotic properties, amongst them: 1) Nod-factors, chemical signals that initiate nodulation in legumes (Schwedock and Long, 1992); 2) biosynthesis of the Fe-S clusters present in the enzymatic complex nitrogenase of bacteroids, essential for its catalytic activity (Parker et al, 2001). Many genetic and biochemical studies about sulphur metabolism and sulphate transport have been performed in enteric bacteria (Van der Ploeg et al, 2001; Kredich, 1987) , however, details of sulphate assimilation in members of the family *Rhizobiaceae* are scarce. Furthermore, since root and nodule metabolism and their interactions are different for each legume-rhizobia association, the type of nutrients used by both bacteria and bacteroids might be specific for each symbiotic relationship (Schubert, 1986).

In one of the few studies about rhizobial sulphur metabolism, a mutant strain of *R. etli* defective in sulphate assimilation was isolated and characterized. This strain, defective in *cysG* gene, was unable to grow in sulphate as the sole sulphur source, and thus defined as cysteine auxotroph (auxotrophy related with a specific compound is defined as the dependence upon this compound for normal growth) (Taté et al., 1997). The *cysG* gene encodes in *R. etli* for a siroheme synthetase, so that cysteine auxotrophy of *cysG* mutant was due to the need of siroheme as a cofactor for the activity of sulphite reductase (SiR) (Murphy et al., 1974), which catalyses reduction of sulphite to

sulphide in the sulphate assimilation pathway (Kreditch NM, 1987; Taté et al., 1997). However, despite its inability to growth with sulphate, this strain was able to induce efficient nitrogen-fixing nodules in *P. vulgaris*, its specific legume host, suggesting that a sulphur source other than sulphate or sulphite (probably cysteine, methionine or glutathione) is provided by the plant to maintain bacterial growth and metabolism inside the roots (Taté et al., 1997). Later, the same authors excluded methionine as a putative sulphur source in the *P. vulgaris* – *R. etli* symbiosis, based on the isolation and characterization of another mutant, defective in methionine biosynthesis (Taté et al., 1999).

Regarding *R. leguminosarum*, a *cysE* gene encoding serine acetyltransferase (SAT), which had been previously characterized in the diazotroph *Azotobacter* (Evans et al., 1991) was analyzed in strain 3841 (Parker et al., 2001). In this work, SAT activity was repressed about 95% in *cysE* mutant, although this strain was not a cysteine auxotroph, suggesting that *R. leguminosarum* RL3841 may possess any redundancy in cysteine biosynthesis, i.e. it possess an alternative pathway which avoids O-acetylserine (since no additional copies of *cysE* were detected in the genome of RL3841). One possibility is that cysteine can be synthesized from methionine; this pathway was characterized in some prokaryotes, such as *Pseudomonas aeruginosa* (Fogolino et al., 1995), *Bacillus subtilis* (Hullo et al., 2007) and, *R. etli* (Taté et al., 1997). Moreover, *cysE* mutant strain was able to infect and form effective nodules in pea. Therefore, in *R. leguminosarum* RL3841 and in many other *Rhizobiaceae*, it is still unclear how the bacteroid obtains sulphur for housekeeping purposes and for the synthesis of nitrogenase (Parker et al., 2001).

In this work, a *R. leguminosarum* mutant strain derivative of Rlv3841 was constructed, defective in RL1262 gene (*cysH*), encoding APS (adenosine 5'-phosphosulphate) reductase, a key enzyme on the S assimilation pathway (Van der Ploeg et al, 2001; Abola et al., 1999; Kopriva et al., 2002). APS reductase catalyzes the reduction of the activated form of sulphate, APS, into sulphite, which after reduction to sulphide by sulphite reductase, is incorporated into cysteine. Although in many prokariots, including *E. coli*, *cysH* encodes for PAPS (phosphoadenosin 5'-

phosphosulphate) reductase, *R. leguminosarum* use APS as a direct substrate for sulphite production, according to Abola et al. (1999).

Double mutant *aap/bra* is defective in two ABC-transporters, which have a broad specificity for the transport of amino acids across the bacteroid membrane, and have been shown to be essential for an effective symbiosis (Lodwig et al., 2003; Prell et al, 2009). Giving the broad specificity of these transporters and their importance for effective symbiosis and nitrogen fixation, *aap/bra* mutant was included in this study in order to elucidate the role of these transporters in the transport of sulphate, sulphur amino acids (cysteine and methionine) and low molecular mass thiols (such as glutathione) inside the bacteroid.

3.2. OBJECTIVES

The main objective of this chapter is to gain further insights into the mechanisms of sulphur acquisition in *R. leguminosarum* in free-living and symbiotic conditions, as an attempt to clear up the existing ambiguity about whether an inorganic sulphur source is used by bacteroids. To achieve this, the following specific objectives are addressed:

- 1) Determine which is the preferred source of sulphur (sulphate or organic sulphur sources) for growth of *R. leguminosarum* in free-living conditions.
- 2) Evaluate if Aap and Bra are essential for the transport of sulphur amino acids and glutathione across the bacterial membrane in free-living *R. leguminosarum*.
- 3) Determine if sulphonates can be used by *R. leguminosarum* as sulphur source for growth, and if APS reductase is essential for the assimilation of these compounds.
- 4) Analyse if the mutation in the *cysH* gene affects *R. leguminosarum* ability to nodulate or fix nitrogen in pea, and/or its ability to growth in the rhizosphere and compete for nodulation with the parental strain 3841.

3.3. EXPERIMENTAL PROCEDURES

1. Construct a *cysH* mutant strain from parent strain Rlv 3841, defective in APS reductase, the only step in S assimilation in *R leguminosarum* that has a single gene encoding it (Material and methods, section I.12.1)
2. Evaluate and compare growth behaviour over 40 h (growth curve) of *cysH* mutant, *aap/bra* double mutant and Rlv 3841 in S-free media supplemented with sulphate, sulphur amino acids and glutathione (section I.12.2).
3. Analyse growth *cysH* mutant and Rlv 3841 in S-free media supplemented with sulphonates (section I.12.2.4).
4. Inoculate *cysH* mutant and Rlv 3841 in Avola peas (separately) and measure nitrogen fixation rate (both by ARA and ANA techniques) (I.13.1 and I.5.4)
5. Perform a rhizosphere competition assay, co-inoculating LMB627 and 3841 in Avola peas (I.13.2).

3.3. RESULTS

3.3.1. Mutagenesis of *cysH* gene

A *cysH* mutant (strain LMB627) was generated by integration of pK19mob containing an internal 370 bp fragment of RL1262 gene amplified from Rlv3841 genomic DNA (Figure I.2). as detailed in material and methods, section I.12.1. According with RhizoBase database (<http://genome.microbedb.jp/rhizobase>), *cysH* gene encodes for APS reductase (EC 1.8.99.2) in several species belonging to the genus *Rhizobia*, such as *R. meliloti*, *R. fredii* and *R. etli* (Abola et al., 1999). Thus, primers to amplify the 370 bp region were designed according to the sequences for *cysH* gene in these species, giving the high genetic homology between *Rhizobia* species. BLAST analysis of the 370 bp fragment, after amplification and cloning, revealed a high homology with an *E. coli* gene encoding for PAPS reductase, also named *cysH*, although its product is likely to be APS reductase.

3.3.2. Growth in sulphur compounds

To test the growth phenotype of LMB627 and parental 3841 strains, and assess their ability to use organic or inorganic sulphur sources, a modified S-free AMS medium was used (see Material and Methods, table I.1). As expected LMB627 failed to grow with sodium sulphate as the sole sulphur source (figure 3.1), at 1 mM, the highest concentration tested. In contrast, 3841 growth in 100 μ M sulphate and reached a final OD₆₀₀ of approximately 0.8 in the exponential phase (which starts after 20 hours growing) (figure 3.1B). *cysH* growth curves in cysteine and MGT values in cysteine are similar to 3841, confirming the LMB627 auxotrophy for cysteine (Table 3.1 and Figure 3.2).

Table 3.1: Mean generation times (MGT) (hours) for LMB627 (*cysH*), 3841 (wild type) and RU1722 (*aap/bra*) strains in S-free medium supplemented with 10 mM and 100 mM sulphate, cysteine, methionine and glutathione. Calculated from cell growth curves, OD_{600 nm} sampled every 30 minutes, n = 4.

strain	sulphate		cysteine		methionine		glutathione	
	10 μ M	100 μ M	10 μ M	100 μ M	10 μ M	100 μ M	10 μ M	100 μ M
3841	8.9	6.0	9.7	10.1	9.6	5.7	11.0	8.7
LMB627	60.7	59.9	10.1	9.6	10.9	8.6	11.4	12.8
RU1722	9.9	7.5	9.1	6.6	9.9	5.2	10.0	11.8

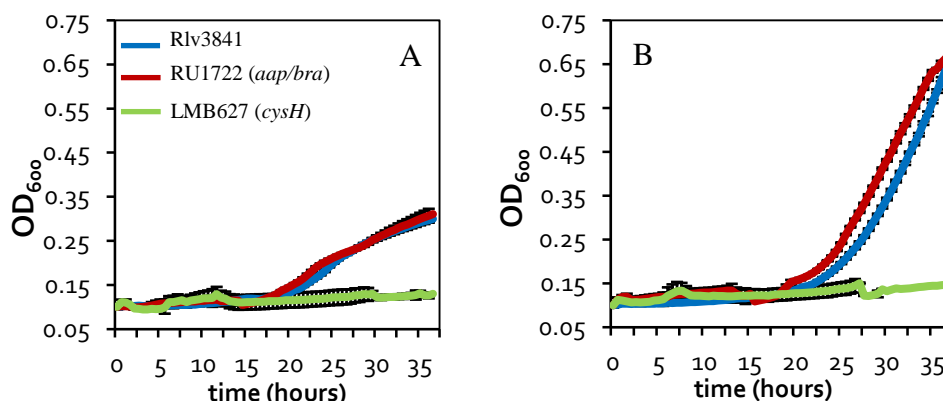


Figure 3.1: Growth rate of Rlv3841, LMB627 and RU1722 (legends in graphs 3.1A) in 10 mM glucose, 10 mM NH₄⁺ S-free medium supplemented with 10 μ M (A) or 100 μ M (B) of Na₂SO₄ (sulphate). OD_{600 nm} of cultures measured each 30 min over 40 hours. Number of replicates is n=4 with standard error values.

Growth rates and MGT values of LMB627 in sulphur amino acids were comparable to wild type values (figures 3.2 and 3.3). It should be noted that, growth of both LMB627 and 3841 strains seem to be impaired (but not disrupted). As appears in graphs figure 3.2, 3841 population tested in cysteine is not able to reach the maximum OD_{600 nm} values reached when the same strain was tested for growth in sulphate.

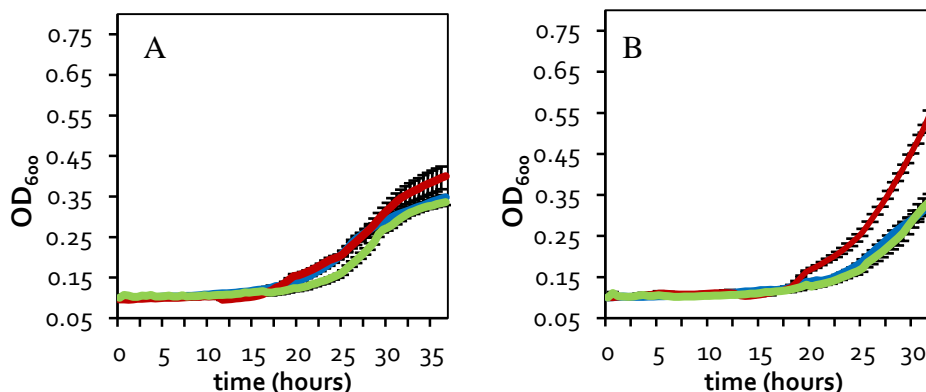


Figure 3.2: Growth rate of Rlv3841, LMB627 and RU1722 in 10 mM glucose, 10 mM NH_4^+ S-free medium supplemented with 10 μM (A) or 100 μM (B) of cysteine. OD (600 nm) of cultures measured each 30 min over 40 hours. Number of replicates is $n = 4$ with standard error values. Legend as in Figure 3.1A.

The other sulphur amino acid tested, methionine, seems to be also a preferred source of sulphur for *R. leguminosarum*, since 3841 growth behaviour in methionine is indistinguishable from the observed for sulphate (considered as the optimal one). Regarding LMB627 behaviour, growth is impaired, compared with the growth rate of 3841, when either 10 μM or 100 μM of methionine was added as sulphur source (fig 3.3A and B). Interestingly, growth curve in 10 μM seems to follow an exponential pattern until an $\text{OD}_{600} \approx 0.280$ is reached, moment from which bacterial population seems to start its stationary phase, meanwhile, bacterial population corresponding to 3841 keep growing within its exponential phase of growth. Also, the pattern observed for the growth curve of LMB627 in 100 μM methionine (fig 3.3B) suggest the possibility of a reversion to wild type, due to the loss of the integration plasmid which is interrupting *cysH* gene, in the absence of antibiotic for selection. In this graph, it can be observed that *cysH* population start growing only after 28 h, moment in which a sudden exponential phase starts.

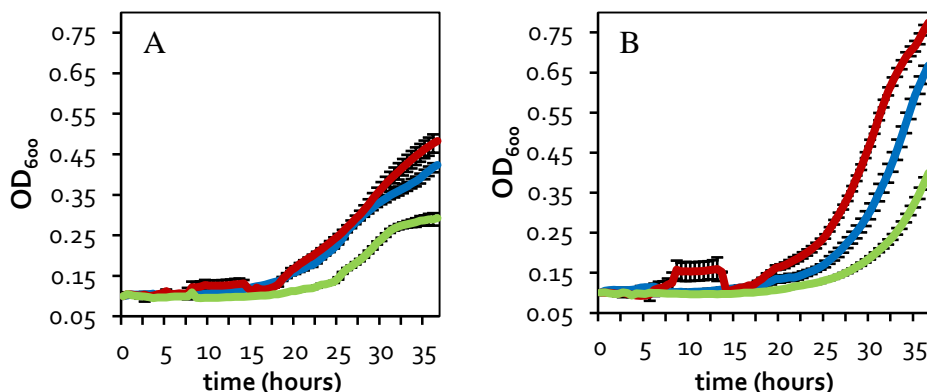


Figure 3.3: Growth rate of Rlv3841, LMB627 and RU1722 in 10 mM glucose, 10 mM NH_4^+ S-free medium supplemented with 10 μM (A) or 100 μM (B) of methionine. $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ of cultures measured each 30 min over 40 hours. Number of replicates is $n = 4$ with standard error values. Legend as in Figure 3.1A.

Use of the thiol tripeptide glutathione ($\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$) (GSH) as sulphur source was also tested (figure 3.4). Growth rates in GSH was similar for both LMB627 and 3841 strains, and in the two concentrations tested; also, they were comparables to the observed for 3841 growing with 10 or 100 μM sulphate, suggesting an important role for this tripeptide in *R. leguminosarum* sulphur nutrition.

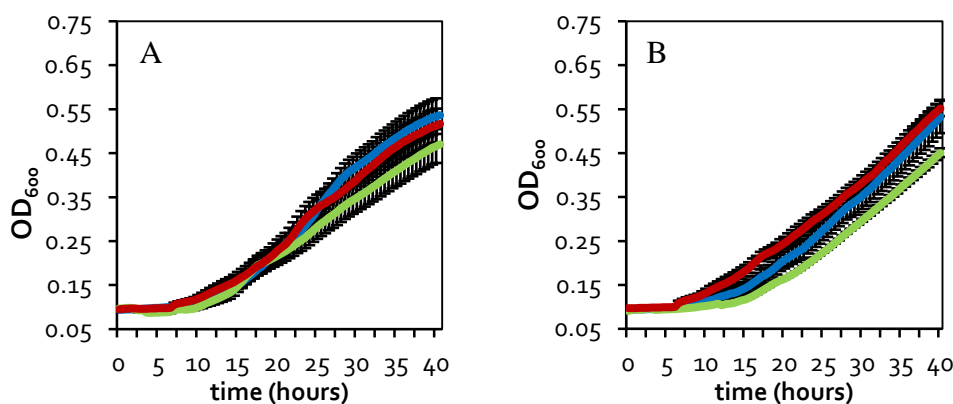


Figure 3.4: Growth rate of Rlv3841, LMB627 and RU1722 in 10 mM glucose, 10 mM NH_4^+ S-free medium supplemented with 10 μM (A) or 100 μM (B) of glutathione; $\text{OD}_{600 \text{ nm}}$ of cultures measured each 30 min over 40 hours. Number of replicates is $n = 4$ with standard error values. Legend as in Figure 3.1A.

Regarding *aap/bra* mutant behaviour in sulphate and sulphur compounds growth curves and MGT in cysteine, methionine and GSH were similar to those of 3841. It should be noted, however, that *aap/bra* grew better than wild type strain in 100 μM cysteine (figure 3.2B), although it could not reach the OD reached when *aap/bra* was grown in 100 μM sulphate (figure 3.1B).

3.3.2.1 Sulphonates

Growth with some common sulphonates found in soils, such as ethane, methane and hexane sulphonates, and taurine, as sulphur sources was also tested both for 3841 and LMB627 strains. In general, growth rate of *R. leguminosarum* parent strain 3841 in these compounds (figure 5) was similar to growth rate of 3841 in sodium sulphate, considered as the optimal one. Mean generation times (MGT) of 3841 in 100 μM sulphonates, however, were slightly higher to MGT in sulphate (table 3.3). In contrast, *cysH* mutant, LMB627 strain grew poorly in sulphonates, even at the highest concentration tested (100 μM), although MGT were not as high as in sulphate (table 3.1).

Table 3.2: Mean generation times (MGT) (hours) for LMB627 (*cysH*) and 3841 strains in S-free medium supplemented with 10 mM and 100 mM sulphonates. Calculated from cell growth curves, OD_{600nm} sampled every 30 minutes, n = 4. Hexane sulphonate (ES), methane sulphonate (MS), ethane sulphonate (HS), taurine.

strain	HS		MS		ES		Taurine	
	10 μM	100 μM	10 μM	100 μM	10 μM	100 μM	10 μM	100 μM
3841	19.4	8.0	18.4	8.9	19.4	10.4	16.9	10.2
LMB627	25.0	22.8	23.4	21.8	21.6	21.8	22.8	24.1

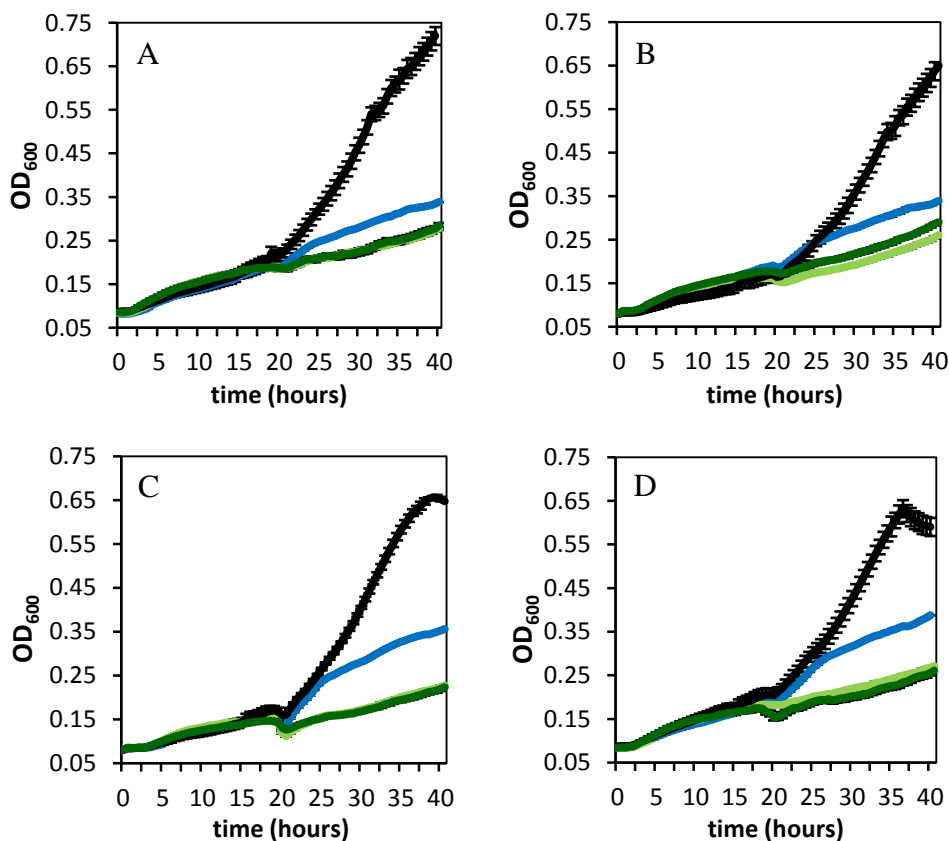


Figure 3.5: Growth rate of Rlv3841 and LMB627 in 10 mM glucose, 10 mM NH_4^+ S-free medium supplemented with 10 μM (A) or 100 μM (B) of hexane sulphonate (A), ethane sulphonate (B), methane sulphonate (C) and taurine (D). OD (600 nm) of cultures measured each 30 min over 40 hours. Number or replicates is $n = 4$ with standard error values. Legend in figure 3.5A

3.3.3. Complementation

Plasmid pLMB730, derivative of pRK415.1, which contains *cysH*, *cysD* and *cysN* plus the putative upstream regulator RL1263 was conjugated into LMB627, giving the new strain LMB625, as detailed in Material and methods (section I.1.12.4.4). Plasmid pLMB730 restored the ability of LMB625 to grow on sulphate (1 mM NaSO_4) as the sole sulphur source due to the functional copy of *cysH* gene provided by the plasmid (figure 3.6). Another new strain (LMB626) was created by transforming *cysH* mutant with empty plasmid pRK415.1, in order to use it as negative control in the complementation assay.

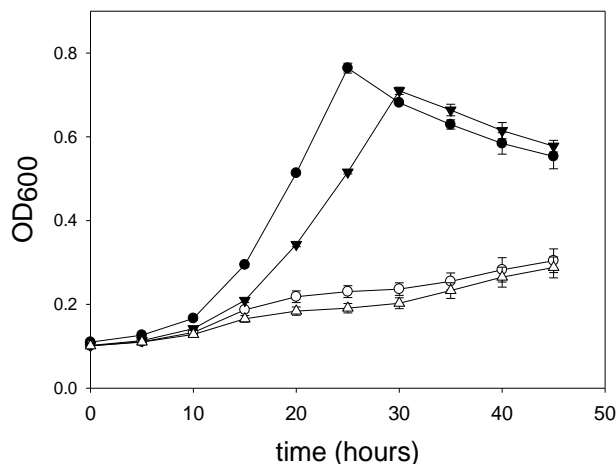


Figure 3.6: complementation of *cysH*: Growth of complemented strain LMB625 (▼), empty vector strain LMB626 (Δ), *cysH* mutant LMB627 (○) and parental strain 3481 (●) in 1 mM sulphate

3.3.4. Rhizosphere competitiveness of *cysH* mutant

The relative ability of a given bacterial strain to infect its host plant and cause development of nodules in the presence of other strains is a measure of competitiveness. In order to determine the effect of the interruption and subsequent inactivation of *cysH* gene on the nodulation competitiveness of *R. leguminosarum*, pea plants were co-inoculated with a 1:1 mixture of strains LMB627 (*cysH* mutant) and 3481 (wild type), and watered either with a normal nitrogen-free rooting solution (see Material and Methods), containing sulphates as the sole sulphur source, or with a modified S-free rooting solution (see Material and Methods). The competitiveness of LMB627 strain was assessed by nodule occupancy, by analysing the percentage of neomycin-resistance colonies (LMB627 strain), related to the total number of colonies isolated from a single nodule (LMB627 + 3481 strains). The mutant was reisolated only from 6% of the nodules, for plants watered with S-free solution, and only from 2% of nodules, for plants watered with normal N-free rooting solution. 25 nodules per plant were tested from 6 plants from each treatment (300 nodules in total), and 10 colonies from each nodule isolation were tested for antibiotic resistance.

Table 3.3: Nodule occupancy by Rlv3841 or LMB627 strains in pea (*Pisum sativum*) nodules after 4 weeks growing with normal N-free rooting solution (control) or S-free plant solution. Values are the percentage (%) of Neo^R + Str^R bacteroids (LMB627 strain) isolated from pea plants nodules inoculated with a 1:1 mixture of 3841 and LMB627 (*cysH*) strains

strain	Control	S-free
3841	97	94
LMB627	2.3	6

3.3.5. Symbiotic phenotype

In order to study the nodulating and fixing phenotype of *cysH* mutant, *P. sativum* cv Avola seeds were inoculated with LMB627 or 3841 strains, as detailed in Material and Methods, section I.13.1.2. After 4 weeks, nitrogen fixation was measured by ARA, and there was no difference in ethylene production between LMB627 and Rlv3841 strains (table 3.5). These results were confirmed later by the ANA technique in another experiment, in which no differences in N fixation rate were observed either between the two strains. Total nodule biomass, as well as root and shoot biomass in these plants, were indistinguishable from those of plants inoculated with 3841 (data not shown), and nodules were red, indicating leghaemoglobin synthesis, both for ARA and ANA experiments. The mutation was stable in the host, since all isolates from nodules infected with LMB627 (6 nodules tested from 5 plants) from both experiments retained the neomycin-phenotype resistance associated with the pLMB536 insertion.

Table 3.4: Acetylene reduction (ARA) of pea (*Pisum sativum*) at 4 weeks. Values are the mean \pm SD of plants inoculated with Rlv3841 or LMB627 (n=5).

strain	ARA ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{ plant}^{-1}$)
3841	1.44 \pm 0.15
LMB627	1.55 \pm 0.10

Table 3.5: Acetylene reduction (ARA) of pea (*Pisum sativum*) at 4 weeks. Values are the mean \pm SD of plants inoculated with Rlv3841 or LMB627 (n=5).

strain	ANA ($\mu\text{mol H}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ DW}$)
3841	6.24 \pm 0.15
LMB627	6.58 \pm 0.37

3.5. DISCUSSION

The absence of growth of the *cysH* mutant on sodium sulphate confirms it is essential for sulphate assimilation. Sulphate is the preferred sulphur source for growth by *R. leguminosarum* 3841, as sodium sulphate provides the best growth rate and the lowest MGT (table 3.1), amongst all the sulphur compounds tested. Also, the impairment of growth with cysteine as sulphur source may be due to its toxicity since at the lower concentration of cysteine tested (10 μ M), the growth rate and final OD₆₀₀ (after 40 h) were similar to that observed for sulphate.

OD₆₀₀ after 40 h with methionine, exponential curve and MGT values suggest that *R. leguminosarum* possess an efficient conversion pathway of methionine to cysteine. Cysteine is the final compound of sulphur assimilation pathway, and the starting point for the biosynthesis of other biological sulphur compounds. Methionine is usually synthesized from cysteine, but also a reverse transsulphuration pathway is present in several microorganisms, like *Pseudomonas aeruginosa* and *Saccharomyces cerevisiae* (Thomas and Surdin-Kerjan, 1997; Vermeij and Kertesz, 1999). In this pathway, methionine is converted in homocysteine and subsequently to cysteine, with the intermediary formation of cystathionine, and serves as a recycling pathway for methionine, and also allows the bacteria to have an efficient sulphur supply when there is no availability of sulphate or cysteine. This recycling pathway of sulphur amino acids has been recently characterized and studied in depth in *Bacillus subtilis* and *Mycobacterium tuberculosis* (Hullo et al, 2007; Wheeler et al., 2005). We speculate that this recycling pathway of methionine to cysteine might be inhibited or down-regulated somehow due to the interruption of *cysH* gene in this mutant strain; *cysH* gene product, APS reductase, might regulate the conversion pathway of methionine to cysteine, apart from its catalytic activity.

Growth rate in glutathione of LMB627 is indistinguishable from that of parent strain 3841, and both were similar to growth rate of 3841 strain in sulphate, considered the optimal one. Glutathione is synthesized from cysteine, and has a central role in the redox responses in microorganisms, plants and animals, being the most potent antioxidant produced by living cells. It has been established that symbiotic proficiency

of rhizobia species depends on their capacity to synthesize GSH (Pauly et al., 2006) and serve also as a sulphur storage molecule (Foyer et al., 2001; Noctor et al., 2002).

Enzymes of S-assimilation have been studied in depth in other members of the family Rhizobiaceae, such as *R. etli* (Taté et al., 1997) and *B. japonicum* (Sugawara et al. 2011). Furthermore, in Chapter 2 of the present work, O-acetylserine(thiol)lyase (OASTL) activity could be measured in isolated bacteroids. OASTL is also a key point in sulphate assimilation, as it allows the organisms to assimilate the inorganic sulphur into cysteine, which is the main organic form of sulphur in living organisms. Results obtained in Chapter 2, along with growth curves of 3841 and *cysH* in different sulphur compounds presented in this Chapter suggest that sulphate is the preferred source of sulphur for both free-living rhizobia and bacteroids in symbiosis, although other sulphur sources are provided by the legume host when sulphur is not available directly.

Aap/bra mutant could grow in sulphate and sulphur amino acids at similar rates as wild type ones. This confirms that amino acids transporters Aap and Bra are not the main transporters for sulphur amino acids and GSH. In fact, both Aap and Bra contribute to the ability of *R. leguminosarum* to grow on amino acids as the sole source of carbon and nitrogen, and double *aap/bra* mutants cannot utilize glutamate, glutamine, asparagines, proline, arginine or GABA. However, growth of *aap/bra* on L-alanine and L-histidine has been previously shown to be also unaffected by the mutations, indicating that *R. leguminosarum* has specific unidentified transporters for these amino acids (Hosie et al., 2002). The present work suggests that sulphur amino acids might also enter in the bacteria and bacteroid via specific transporters.

Plasmid pLMB730, carrying a functional copy of *cysH* gene, is able to complement *cysH* mutant and restore its inability to growth in sulphate, thus confirming that APS reductase is encoded only by this gene in *R. leguminosarum*. Krusell et al. (2005), identified and characterized a gene in *Lotus japonicus*, expressed only in symbiosis with *Mesorhizobium loti*, which was proposed to encode a sulphate transporter located in the symbiosome membrane (Wienkoop and Saalback, 2003). *Lotus* mutants lacking this gene formed normal nodules but were not able to fix nitrogen and it was concluded that sulphate transport into the symbiosome is essential for nitrogen fixation in *Lotus*. Unless the sulphate is incorporated into an organic

sulphur source in the symbiosome space this implies that bacteroids use sulphate as their sulphur source. However, in the *R etli* -bean symbiosis a pleiotropic mutant of *R. etli* in siroheme synthase still fixed nitrogen even though this strain cannot utilise sulphate as a sulphur source (Taté et al. 1997). This suggests that the host plant could provide their symbiotic bacteria with an organic sulphur source such as cysteine, glutathione or methionine. However, siroheme synthase is needed for utilisation of sulphate as a sulphur source as well as nitrate as a nitrogen source because it is required as a cofactor for the activity of sulphite reductase and nitrate reductase, enzymes of the assimilation pathways of sulphate and nitrate, respectively. For this reason we chose to mutate the *cysH* gene in *R. leguminosarum*, encoding APS-reductase, which is the only metabolic step that is essential for sulphur assimilation alone. Despite its inability to assimilate sulphate, the *cysH* strain LMB627 was able to induce efficient nitrogen-fixing nodules on *P. sativum*

However, the inability to assimilate sulphate led to a decreased competitiveness of the *cysH* strain, with only 2 and 6% of bacteroids isolated from nodules of co-inoculated plants (supplied with and without sulphate in the nutrient solution, respectively) contained the LMB627 mutant (table 3.4). Growth of rhizobia in the rhizosphere could be compromised by a variety of factors, including nutrient stress. Several studies have demonstrated that inactivation of a single bacterial gene can result in a detectable phenotypic change in competitiveness (Triplett and Sadowsky, 1992; Tate et al, 1997). Growth of LMB627 in the rhizosphere will almost certainly be impaired due to its ability to assimilate sulphate as this was the only sulphur source in the medium. It also implies that plant roots do not release significant amounts of organic sulphur to rescue the growth of LMB627. However, when strain LMB627 was the only bacterial strain in the rhizosphere, it colonized roots despite its impaired growth, and after invading the plant its growth inside infection threads and differentiation into bacteroids was supported by the organic sulphur sources provided by the plant.

The conclusion of our work and that of Taté et al. (1997) is that organic sulphur sources are provided in sufficient quantities by the plant to support nitrogen-fixation by their bacteroids. This begs the question of why the SST1 sulphate transporter is needed

on the symbiosome membrane of *L. japonicus*, according to Krusell et al. (2005). The first possibility is simply that *L. japonicus* is different from pea and beans and it does provide sulphate as the sulphur source to *Mesorhizobium loti* bacteroids. As already pointed out, root and nodule metabolism and their interactions are different for each legume-rhizobia association, and the type of nutrients used by both bacteria and bacteroids might be specific for each symbiotic relationship (Schubert, 1986). A second possibility is that sulphate is taken into the symbiosome space of all three plants and converted to an organic sulphur source, which is then made available to bacteroids. While this seems unlikely it remains a formal possibility. However, a third possibility is that SST1 is required for molybdate uptake across the symbiosome membrane and molybdate is essential for function of nitrogenase in the FeMoCo factor. Sulphate and molybdate are taken up by the same transporter, at least in bacteria (Sirko et al., 1990; Aguilar-Barajas et al., 2011; and references therein), and the possibility that SST1 might transport molybdate was recognised in the original characterisation (Sirko et al., 1990). In plants, the involvement of S transporters in molybdate acquisition has been described in *Phaseolus vulgaris* (Kannan and Ramani, 1972) and in the forage legume *Stylosanthes hamata* (Fitzpatrick et al., 2008), although co-transport of these anions across the symbiosome membrane remains an open question.

3.5. CONCLUSIONS OF CHAPTER 3

In the present work, a mutant strain of *R. leguminosarum*, *cysH* mutant, defective in APS reductase, the only step in sulphate assimilation that has a single enzyme encoding it, was constructed, as an attempt to clear up the existing ambiguity about whether an inorganic sulphur source is used by *R. leguminosarum* bacteroids. The main conclusions of this work are:

1- *cysH* mutant was unable to grow with sulphate as the sole sulphur source, confirming that APS reductase is essential for S assimilation in *R. leguminosarum*.

2-Sulphate is the preferred source for growth by *R. leguminosarum*, as sodium sulphate provides the best growth rate for the parent strain. Growth of *cysH* mutant in methionine and sulphonates was impaired but not interrupted, suggesting that the lack of APS reductase compromise somehow its performance in these compounds.

3-Despite its inability to assimilate sulphate, the *cysH* strain LMB627 was able to induce efficient nitrogen-fixing nodules on *P. sativum* when it was the only bacterial strain in the rhizosphere. However, the decreased competitiveness of *cysH* to nodulate in the presence of the parent strain is certainly due to an impaired growth of *cysH* in the rhizosphere, due to its mutation. Therefore, it is concluded that sulphate is not an essential element for the growth of bacteroids.

4- Growth of *aap/bra* mutant in sulphate, cysteine, methionine and glutathione was indistinguishable from that of parent strain, confirming that nor Aap nor Bra are the main transport systems for sulphur amino acids or glutathione, despite their broad specificity, and suggesting the existence of specific transport systems for these compounds.

GENERAL CONCLUSIONS

GENERAL CONCLUSIONS

1- S deficiency during 21 or 28 days provoked a drastic inhibition of nitrogen fixation in pea plants, along with a proportional decline in nodule biomass, and also concomitant to a decline in nodule content of GSH and hGSH, which highlights the strong correlation between the BNF and the nodule GSH and hGSH content.

2- The lower concentration of amides, along with an accumulation of branched-chain, aromatic and N-rich amino acids in S limited nodules suggest an imbalance between N and S metabolism under S deficiency. Furthermore, despite the inhibition of sucrose synthase, malate accumulated in S-deprived nodules, probably due to impairment in bacteroid metabolism, which would be the main cause of BNF inhibition in S-limited conditions.

3- Nodules contribute significantly to the general pool of cysteine in nodulated pea plants, since nodules showed the highest level of OASTL activity and expression, and also the highest content of thiols (glutathione and cysteine) of the plant.

4- S limitation provoked an induction in OASTL activity and protein levels of the cytosolic isoform OASA in shoots and roots of pea plants, whereas a repression was observed in nodules after a long period of S deficiency (28 days), which was correlated with a decline in the protein levels of OASA in nodules.

5- There was a significant decay in OASTL, at the level of activity, protein abundance and gene expression levels in drought-stressed nodules, concomitantly with an inhibition of nitrogen fixation in water limited conditions. Thiol accumulation in all tissues as a response to water restriction is in accordance to its role in the plant defence against ROS produced by drought and other abiotic stresses.

6- *cysH* mutant was unable to grow with sulphate as the sole sulphur source, confirming that APS reductase is essential for S assimilation in *R. leguminosarum*.

7- Sulphate is the preferred source for growth by *R. leguminosarum*, as it provided the best growth rate for the parent strain. Growth of *cysH* mutant in

methionine and sulphonates was impaired, suggesting that the lack of APS reductase compromise somehow its performance in these compounds.

8- Inability to assimilate sulphate of *cysH* mutant did not affect its efficiency to fix nitrogen in symbiosis with *P. sativum*, although its competitiveness in the presence of the parent strain was impaired due to the mutation. Therefore, it is concluded that sulphate is not an essential element for the growth of bacteroids.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

1- La deficiencia de S durante 21 o 28 días provocó una drástica inhibición de la fijación de nitrógeno en plantas de guisante, además de un descenso proporcional en la biomasa nodular, y un descenso en la concentración de GSH y hGSH en nódulos, lo cual pone de manifiesto la estrecha correlación entre la FBN y el contenido nodular de estos tioles.

2- La baja concentración de amidas, junto con la acumulación de aminoácidos aromáticos, de cadena ramificada y aminoácidos ricos en N en nódulos de plantas sometidas a déficit de S sugiere un desequilibrio entre el metabolismo del N y del S en condiciones de deficiencia de S. Además, a pesar de la inhibición de sacarosa sintasa, el malato se acumuló en nódulos de plantas –S, probablemente debido a una inhibición del metabolismo del bacteroide, lo cual podría ser la principal causa de la inhibición de la FBN en condiciones de limitación de S.

3- Los nodules contribuyen de manera significativa al “pool” general de cisteína en plantas de guisante noduladas, ya que en nódulos se obtuvieron los mayores niveles de actividad y expresión de OASTL, y también la mayor concentración de tioles (glutatión y cisteína) de la planta.

4- La limitación de S provocó una inducción en la actividad OASTL y un aumento en los niveles de proteína de la isoforma citosólica OASA en parte aérea y raíz de plantas de guisante, mientras que en nódulos sometidos a un largo período de limitación de S (28 días), se observó una represión de la actividad enzimática y un descenso en los niveles de proteína de OASA.

5- Se observó un descenso significativo en OASTL, a nivel de actividad, abundancia de proteína y expresión génica en nodules sometidos a sequía, lo cual se correlacionó con una inhibición en la fijación de nitrógeno en condiciones de déficit hídrico. La acumulación de tioles en todos los tejidos en respuesta al déficit hídrico está relacionada con su papel en la defensa de la planta frente a ROS en respuesta a sequía y otros estreses abióticos.

6- El mutante *cysH* no fue capaz de crecer con sulfato como única fuente de azufre, confirmando que la APS reductasa es esencial para la asimilación de S en *R. leguminosarum*.

7- El sulfato es la fuente preferida de azufre para el crecimiento de *R. leguminosarum*, ya que la cepa parental presentó su tasa óptima de crecimiento en sulfato, de entre todos los compuestos azufrados que se usaron. El crecimiento del mutante *cysH* en metionina y sulfonatos fue inhibido, sugiriendo que falta de APS reductasa compromete de algún modo su crecimiento en estos compuestos.

8- La incapacidad del mutante *cysH* para asimilar sulfato no afectó su eficiencia fijadora en simbiosis con *P. sativum*, a pesar de que su competitividad para nodular en presencia de la cepa parental se vio muy limitada, debido a esta mutación. Se puede concluir que el sulfato no es esencial para el crecimiento de los bacteroides en el interior de la planta hospedadora.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

- Abola AP, Willits MG, Wang RC, Long SR** (1999) Reduction of adenosine - 5'-phosphosulphate instead of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulphate in cysteine biosynthesis by *Rhizobium meliloti* and other members of the family *Rhizobiaceae*. *J. Bacteriol.* 181: 5280-5287.
- Abreu I, Cerda ME, Nanclores, MP, Baena I, Lloret J, Bonilla I, Bolanos L, Reguera M** (2012) Boron deficiency affects rhizobia cell surface polysaccharides important for suppression of plant defense mechanisms during legume recognition and for development of nitrogen-fixing symbiosis. *Plant Soil* 361: 385-395.
- Aguilar-Barajas E, Díaz-Pérez C, Ramírez-Díaz MI, Riveros-Rosas H, Cervantes C** (2011) Bacterial transport of sulphate, molybdate, and related oxyanions. *Biometals* 24: 687-707.
- Aldasoro J** (2011) Efecto de la variación de la transpiración en la respuesta de la fijación biológica de nitrógeno en plantas de guisante (*Pisum sativum* L.) en distintas condiciones de disponibilidad de agua. Trabajo fin de Máster. Universidad Pública de Navarra.
- Allaway D, Lodwig EM, Crompton LA, Wood M, Parsons TR, Wheeler T, Poole PS** (2000) Identification of alanine dehydrogenase and its role in mixed secretion of ammonium and alanine by pea bacteroids. *Mol. Microbiol.* 36: 508-515.
- Althabegoiti MJ** (2010) Optimización de inoculantes para la agricultura sustentable en soja: rol de los flagelos de *Bradyrhizobium japonicum* en la competición para la nodulación. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de la Plata (Argentina).
- Alvarez C, Calo L, Romero LC, García I, Gotor C** (2010) An O-acetylserine(thiol)lyase homolog with L-cysteine desulphydrase activity regulates cysteine homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 152: 656-669.
- Alvarez C, García I, Moreno I, Perez-Perez ME, Crespo JL, Romero LC, Gotor C** (2012) Cysteine-generated sulfide in the cytosol negatively regulates autophagy and modulates the transcriptional profile in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 4621-4634.
- Álvarez C, Lozano-Juste J, Romero LC, García I, Gotor JL, León J** (2011) Inhibition of *Arabidopsis* O-acetylserine(thiol)lyase by tyrosine nitration. *J. Biol. Chem.* 286: 578-586.
- Amir R** (2010) Current understanding of the factors regulating methionine content in vegetative tissues of higher plants. *Amino Acids* 39:917-31.
- Aparicio-Tejo PM, Arrese-Igor C, Becana M** (2000) Fijación biológica de nitrógeno. In: Azcón-Bieto J, M Talón, eds. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. McGraw-Hill Interamericana de España, SAU, Madrid. pp 247-260.
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.
- Appleby CA** (1984) Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 35: 443-478.
- Argillier C, Drevon JJ, Zengra M, Salsac L** (1989) Relation between nitrogenase activity and stem or xylem sap ureide content of soybean plants (*Glycine max* L Merr) *Plant Sci.* 61: 37-42.
- Arrese-Igor C, González EM, Gordon AJ, Minchin FR, Gálvez L, Royuela M, Cabrerizo PM, Aparicio-Tejo PM** (1999) Sucrose synthase and nodule nitrogen fixation under drought and other environmental stresses. *Symbiosis* 27: 189-212.

- Arrese-Igor C, Gonzalez EM, Marino D, Ladrera R, Larrainzar E, Gil-Quintana E** (2011) Physiological responses of legume nodules to drought. In: Anjum NA, Lopez-Lauri F (Eds) *Plant Nutrition and Abiotic Stress Tolerance III. Plant Stress 5 (Special Issue 1)*, pp 24-31. ISBN: 978-4-903313-61-0
- Asada K** (1992) Ascorbate-peroxidase - a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plantarum* 85: 235-241.
- Atlas RM, Bartha R** (2002) Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4ª Ed. Prentice Hall, Pearson Educación SA, Madrid. ISBN: 84-7829-039-7.
- Azpilikueta M, Aparicio-Tejo PM, Lamsfus C, Muro J, Irigoien I** (2002) Response of different cultivar of sugar snap pea grown in the Ebro Valley. In: Book of Proceedings: VII Congress of the European Society for Agronomy. Villalobos FJ, Testi L, eds. pp. 163-164.
- Barroso C, Romero LC, Cejudo FJ, Vega JM, Gotor C** (1999) Salt-specific regulation of the cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene from *Arabidopsis thaliana* is dependent on abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* 40: 729-736.
- Barroso C, Vega JM, Gotor C** (1995) A new member of the cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase family in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters* 363: 1-5.
- Barroso C, Vega JM, Gotor C** (1998) The role of roots in cysteine biosynthesis by *Arabidopsis thaliana*. *J. Physiol. Biochem.* 54: 189-194.
- Barsch A, Tellstrom V, Patschkowski T, Kuster H, Niehaus K** (2006) Metabolite profiles of nodulated alfalfa indicate that distinct stages of nodule organogenesis are accompanied by global physiological adaptations. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19: 998-1013.
- Basterrechea M, Hicks JR** (1991) Effect of maturity on carbohydrate changes in sugar snap pea pods during storage. *Sci. Hort.* 48: 1-8.
- Beatty PH, Good AG** (2011) Future prospects for cereals that fix nitrogen. *Science* 333: 416-417.
- Bergersen FJ, Turner GL** (1990) Bacteroids from soybean root nodules: respiration and N fixation in flow chamber reactions with oxyleghaemoglobin. *Proc. Roy. Soc. B* 228: 296-320
- Bergersen FJ, Turner GL** (1993) Effects of concentration of substrates supplied to N fixing soybean bacteroids in flow chamber experiments. *Proc. Royal Transact. Soc. B* 251:95-102.
- Beringer JE** (1974) R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 84: 188-198.
- Bermúdez MA** (2011) Identificación de una nueva enzima cloroplástica con actividad S-Sulfocisteína sintasa esencial para la función del cloroplasto en *Arabidopsis thaliana*. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Bermudez MA, Galmes J, Moreno I, Mullineaux PM, Gotor C, Romero LC** (2012) Photosynthetic adaptation to length of day is dependent on S-sulfocysteine synthase activity in the thylakoid. *Plant Physiol.* 160: 274-288.
- Bermudez MA, Paez-Ochoa MA, Gotor C, Romero LC** (2010) *Arabidopsis* S-sulfocysteine synthase activity is essential for chloroplast function and long-day light dependent redox control. *Plant Cell* 22: 403-416.

- Beukes CW, Venter SN, Law IJ, Phalane FL, Steenkamp ET** (2013) South African papilionoid legumes are nodulated by diverse *Burkholderia* with unique nodulation and nitrogen-fixation loci. *PLoS One* 8. Doi: 10.1371/journal.pone.0068406.
- Bhattacharjee RB, Singh A, Mukhopadhyay SN** (2008) Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 199-209.
- Bick JA, Dennis JJ, Zylstra GJ, Nowack J, Leustek T** (2000) Identification of a new class of 5'-Adenylylsulphate (APS) reductases from sulphate-assimilating bacteria. *J Bacteriol.* 182: 135-142.
- Boddey RM, Oliveira OCD, Urquiaga S, Reis VM, Olivares FLD, Baldani VLD, Döbereiner J** (1995) Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant Soil* 174: 195-209.
- Bohloul BB, Ladha JK, Garrity DP, George T** (1992) Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture: A perspective. *Plant Soil* 141: 1-11.
- Bonilla I** (2003) Introducción a la nutrición mineral de las plantas. Los elementos minerales. In: Fundamentos de Fisiología Vegetal. Eds. Azcón Bieto J and Talón M. McGraw Hill Interamericana de España, Madrid. ISBN: 84-486-0258-7. pp 113-130.
- Bonilla I, Bolanos L** (2010) Mineral Nutrition for Legume-Rhizobia Symbiosis: B, Ca, N, P, S, K, Fe, Mo, Co, and Ni: A Review. In: *Organic Farming, Pest Control and Remediation of Soil Pollutants*. Sustainable Agriculture Reviews 1: 253-274. Ed. Eric Lichtfouse. ISBN: 978-1-4020-9653-2. Doi: 10.1007/978-1-4020-9654-9_13.
- Bork C, Schwenn JD, Hell R** (1998) Isolation and characterization of a gene for assimilatory sulphite reductase from *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 212: 147-153.
- Bournaud C, de Faria SM, dos Santos JMF, Tisseyre P, Silva M, Chaintreuil C, Gross E, James EK, Prin Y, Moulin L** (2013) *Burkholderia* Species Are the Most Common and Preferred Nodulating Symbionts of the Piptadenia Group (Tribe Mimoseae). *PLoS One* 8: e63478/journal.pone.0063478.
- Bown AW, and Shelp BJ** (1989) The metabolism and physiological roles of 4-aminobutyric acid. *Life Sci. Adv.* 8:21-25.
- Bradford MM** (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bremner JM and Steele CG** (1978) Role of microorganisms in the atmospheric sulphur cycle. *Adv. Microb Ecol.* 2: 155-201.
- Brito B, Baginski C, Palacios JM, Cabrera E, Ruiz-Argüeso T, Imperial J** (2005) Biodiversity of hydrogenase systems from legume endosymbiotic bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 33-35.
- Broekaert WF, Terras FRG, Cammue BPA, Osborn RW** (1995) Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* 108: 1353-1358.
- Brunold C** (1990) Reduction of sulphate to sulphide. In: Rennenberg H, Brunold C, De Kok LJ, Stulen I, eds. *Sulphur nutrition and sulphur assimilation in higher plants*. The Hague, The Netherlands: SPB Academic Publishing, 13-31.

- Brunold C, Suter M** (1989) Localization of enzymes of assimilatory sulphate reduction in pea roots. *Planta* 179: 228-234.
- Buchner P, Takahashi H, Hawkesford MJ** (2004) Plant sulphate transporters: co-ordination of uptake, intracellular and long-distance transport. *J. Exp. Bot.* 55: 1765-1773.
- Cardenas L, Vidali L, Dominguez J, Perez H, Sánchez F, Hepler PK, Quinto C** (1998) Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signals. *Plant Physiol.* 116: 871-877.
- Carfagna S, Salbitani G, Vona V, Esposito S** (2011) Changes in cysteine and O-acetyl-L-serine levels in the microalga *Chlorella sorokiana* in response to the S-nutritional status. *J. Plant Physiol.* 168: 2188-2195.
- Carfagna S, Vona V, Di Martino V, Esposito S, Rigano C** (2011) Nitrogen assimilation and cysteine biosynthesis in barley: evidence for root sulphur assimilation upon recovery from N deprivation. *Environ. Exp. Bot.* 71: 18-24.
- Casieri L, Gallardo K, Wipf D** (2012) Transcriptional response of *Medicago truncatula* sulphate transporters to arbuscular mycorrhizal symbiosis with and without sulphur stress. *Planta* 235: 1431-1447.
- Catoira R, Galera C, de Billy F, Penmetsa RV, Journet EP, Maillet F, Rosenberg C, Cook D, Gough C, Denarie J** (2000) Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell* 12: 1647-1665.
- Chan KX, Wirtz M, Estavillo GM, Pogson BJ** (2013) Balancing metabolites in drought: the sulphur assimilation conundrum. *Trends Plant Sci.* 18: 18-29.
- Chandler PM, Higgins TJV, Randall PJ, Spencer D** (1983) Regulation of legumin levels in developing pea seeds under conditions of sulphur deficiency. Rates of legumin synthesis and levels of legumin mRNA. *Plant Physiol.* 71: 47-54.
- Charpentier M and Oldroyd GED** (2010) How close we are to nitrogen-fixing cereals? *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 556-564.
- Chen RD** (1998) Plant NADP-dependent isocitrate dehydrogenases are predominantly localized in the cytosol. *Planta* 207: 280-285.
- Chen W, Laevens S, Lee T, Coenye T, De Vos P, Mergeay M, Vandamme P** (2001) *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1729-1735.
- Chourey PS, Taliercio EW, Carlson SJ, Ruan YL** (1998) Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity, and the other for starch biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 259: 88-96.
- Cleveland CC, Townsend AR, Schimel DS, Fischer H, Howarth RW, Hedin LO, Perakis SS, Latty EF, Von Fischer JC, Elseroad A, Wartson MF** (1999) Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochem. Cycles.* 13: 623-635.
- Cobbett C, Goldsbrough P** (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 159-182.
- Craig J, Barratt P, Tatge H, Dejardin A, Handley L, Gardner CD, Barber L, Wang T, Hedley C, Martin C, Smith AM** (1999) Mutations at the *rug4* locus alter the carbon and

- nitrogen metabolism of pea plants through and effect on sucrose synthase. *Plant J.* 17: 353-362.
- Crockard MA, Bjourseon AJ, Dazzo FB, Cooper JE** (2002) A white clover noduline gene, *dd23b*, encoding a cysteine cluster protein, is expressed in roots during the very early stages of interaction with *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* and after treatment with chitooligosaccharide Nod factors. *J. Plant. Res.* 115, 439-447.
- Cullimore JV, Bennett MJ** (1988) The molecular biology and biochemistry of plant glutamine synthetase from root nodules of *Phaseolus vulgaris* and other legumes. *J. Plant Physiol.* 132: 387-393.
- Dalton DA** (1992) Effects of paraquat on the oxygen free radical biology of soybean root nodules. *Bull. Environ. Contam. Tox.* 48: 721-726.
- Dalton DA, Joyner SL, Becana M, Iturbe-Ormaetxe I, Chatfield JM** (1998) Antioxidant defenses in the peripheral cell layers of legume root nodules. *Plant Physiol.* 116: 37-43.
- Davidian JC, Kopriva S** (2010) Regulation of sulphate uptake and assimilation- the same or not the same? *Mol. Plant* 3: 314-325.
- Dawson JO** (2008) Ecology of actinorhizal plants. In: Pawlowski K, Newton WE, eds. Nitrogen-fixing actinorhizal symbioses. *Nitrogen fixation: origins, applications, and research progress*. Vol., 6. Dordrecht: Springer, 199-234.
- Day DA, Copeland L** (1991) Carbon metabolism and compartmentation in nitrogen-fixing legume nodules. *Plant Physiol. Bioch.* 29: 185-201.
- Day DA, Kaiser BN, Thomson R, Udvardi MK, Moreau S, Puppo A** (2001a) Nutrient transport across symbiotic membranes from legume nodules. *Aust. J. Plant Physiol.* 28: 667-674.
- Day DA, Poole PS, Tyerman SD, Rosendahl L** (2001b) Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 61-71.
- De Felipe MR** (2006) Fijación biológica de dinitrógeno atmosférico en vida libre. En: Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones. Ed. EJ Bedmar, J González, C Lluch, B Rodelas. SEFIN, Granada, pp 9-16.
- De Kok LJ, Castro A, Durenkamp M, Stuiver CEE, Westerman S, Yang L, Stulen I** (2002) Sulphur in plant physiology. In: Sulphur Fertilisers: Demand, Production and Use. Proceedings No. 500. The International Fertiliser Society, York, U.K. pp. 1-26. ISBN 0-85310-36-1.
- De Kok LJ, Durenkamp M, Yang L, Stulen I** (2007). Atmospheric sulphur. In: Hawkesford MJ, De Kok LJ, eds. *Sulphur in plants - an ecological perspective*. Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp: 91-106. ISBN: 978-1-4020-5886-8.
- De Ron AM** (2001) Guisante. En: La Horticultura Española. Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Nuez F, Llácer G, eds. Mundi-Prensa, Reus (Barcelona), pp. 171-173
- Denarié J, Debelle F, Prome JC** (1996) *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 503-535.
- Denison RF** (1992) Mathematical modeling of oxygen diffusion and respiration in legume root nodules. *Plant Physiol.* 98: 901-907.

- Die JV, Román B, Nadal S, González-Verdejo CI** (2010) Evaluation of candidate reference genes for expression studies in *Pisum sativum* under different experimental conditions. *Planta* 232: 145-153.
- Djekoun A, Planchon C** (1991) Water status effect on dinitrogen fixation and photosynthesis in soybean. *Agron. J.* 83: 316-322.
- Dominguez-Solis JR, Gutierrez-Alcala G, Vega JM, Romero LC, Gotor C** (2001). The cytosolic O-acetylserine(thiol)lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance. *J. Biol. Chem.* 276: 9297-9302.
- Dominguez-Solis JR, López-Martín MC, Ager FJ, Ynsa MD, Romero LC, Gotor C** (2004) Increased cysteine availability is essential for cadmium tolerance and accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnol. J* 2: 469-476.
- Droux M** (2004) Sulphur assimilation and the role of sulphur in plant metabolism: a survey. *Photosynth. Res.* 79: 331-348.
- Droux M, Ruffet ML, Douce R, Job D** (1998) Interactions between serine acetyltransferase and O-acetylserine (thiol) lyase in higher plants-structural and kinetic properties of the free and bound enzymes. *Eur. J Biochem.* 255: 235-245.R
- Duke SH, Henson CA** (1985) Legume nodule carbon utilization in the synthesis of organic acids for the production of transport amides and amino acids. En: Nitrogen Fixation and CO₂ Metabolism. Ed. PW Ludden, JE Burris. Elsevier Press, Nueva York, USA, pp 292-302.
- Durand JL, Sheehy JE, Minchin FR** (1987). Nitrogenase activity, photosynthesis and nodule water potential in soybean plants experiencing water-deprivation. *J.Exp. Bot.* 38:311-321.
- Egland PG, Pelletier DA, Dispensa M, Gibson J, Harwood CS** (1997) A cluster of bacteria genes for anaerobic benzene ring biodegradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6484-6489.
- Elmore JS, Parker JK, Halford NG, Muttucumaru N, Mottram DS** (2008) Effects of plant sulphur nutrition on acrylamide and aroma compounds in cooked wheat. *J. Agric. Food Chem.* 56: 6173-6179.
- Evans DJ, Jones R, Woodley PR, Wilborn JR, Robson DL** (1991) Nucleotide sequence and genetic analysis of the *Azotobacter chroococcum nifUSVWZM* cluster, including a new gene (*nifP*) wich encodes a serine acetyltransferase. *J. Bacteriol.* 173: 5457-5489.
- Fay P** (1992) Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol. Rev.* 56: 340-373.
- Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin MH, Lin YH, Reid DE, Gresshoff PM** (2010) Molecular analysis of legume nodule development and autorregulation. *J. Integr. Plant Biol.* 52: 61-76.
- Ferri A, Lluch C, Ocaña A** (2000) Effect of salt stress on carbon metabolism and bacteroid respiration in root nodules of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Biol.* 2: 396-402.
- Figurski DH, Helinski DR** (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1648-1652.
- Finan TM, Wood JM, Jordan DC** (1983) Symbiotic properties of C₄-dicarboxylic acid transport mutants of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 154: 1403-1413.

- Flemetakis E, Efrose RC, Ott T, Stedel C, Aivalakis G, Udvardi MK, Katinakis P** (2006) Spatial and temporal organization of sucrose metabolism in *Lotus japonicus* nitrogen-fixing nodules suggest a role for the elusive alkaline/neutral invertase. *Plant Mol. Biol.* 62: 53-69.
- Fodor J, Gullner G, Adam AL, Barna B, Komives T, Kiraly Z** (1997) Local and systemic responses of antioxidants to tobacco virus infection and to salicylic acid in tobacco (role in systemic acquired resistance). *Plant Physiol.* 114: 1443-1451.
- Fogolino M, Borne F, Bally M, Ball G, Patte JC** (1995) A direct thiolation pathway is used for methionine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 141: 431-439.
- Foyer CH, Noctor G** (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol.* 155: 2-18.
- Foyer CH, Theodoulou FL, Delrot S** (2001) The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants. *Trends Plant Sci.* 6: 486-492.
- Franssen HJ, Vijn I, Yang WC, Bisseling T** (1992) Developmental aspects of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Mol. Biol.* 19: 89-107.
- Frechilla S** (1994) Influencia de la nutrición nitrogenada en la respuesta de *Pisum sativum* L. al déficit hídrico. Tesis Doctoral. Universidad Pública de Navarra.
- Fredeen AL, Rao IM, Terry N** (1989) Influence of phosphorus nutrition on growth and carbon partitioning in *Glycine max*. *Plant. Physiol.* 89, 225-230.
- Frendo P, Gallesi D, Turnbull R, Van de Sype G, Herouart D, Puppo A** (1999) Localization of glutathione and homogluthathione in *Medicago truncatula* is correlated to a differential expression of genes involved in their synthesis. *Plant J.* 17: 215-219.
- Frendo P, Harrison J, Norman C, Hernández-Jimenez MJ, Van de Sype G, Gilabert A, Puppo A** (2005) Glutathione and homogluthathione play a critical role in the nodulation process of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant Microbe In.* 18: 254-259.
- Friedrich CG** (1998) Physiology and genetics of sulphur-oxidizing bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 39: 235-289.
- Fitzpatrick KL, Tyerman SD, Kaiser BN** (2008) Molybdate transport through the plant sulphate transporter SHST1. *FEBS Letters* 582: 1508-1513.
- Fujiata K, Ofosu-Budu KG, Ogata S** (1992) Biological nitrogen fixation in mixed legume-cereal cropping systems. *Plant Soil* 141: 155-175.
- Gage DJ** (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 68: 280-300.
- Gaitonde MK** (1967) A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. *Biochem. J.* 104: 627-633.
- Galloway JN, Schlesinger WH, Levy H, Michaels A, Schnoor JL** (1995) Nitrogen fixation, anthropogenic enhancement and environmental response. *Global Biogeochem. Cycles* 9: 235-252.
- Gálvez L** (2004) Metabolismo nodular en *Pisum sativum* L en respuesta a estrés hídrico. Interacciones carbono/nitrógeno y posibles moléculas implicadas en la modulación de la respuesta. Tesis Doctoral. Universidad Pública de Navarra.

- Gálvez S, Hirsch AM, Wycoff KL, Hunt S, Layzell DB, Kondorosi A, Crespi M** (2000) Oxygen regulation of a nodule-located carbonic anhydrase in alfalfa. *Plant Physiol.* 124: 1059-1068.
- García I, Castellano JM, Vioque B, Solano R, Gotor C, Romero LC** (2010) Mitochondrial {beta}-cyanoalanine synthase is essential for root hair formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 22: 3268-3279.
- García-Fraile P, Carro L, Robledo M, Ramírez-Bahena MH, Flores-Felix JD, Fernández MT, Mateos PF, Rivas R, Igual JM, Martínez-Molina E, Peix A, Velázquez E** (2012) *Rhizobium* Promotes Non-Legumes Growth and Quality in Several Production Steps: Towards a Biofertilization of Edible Raw Vegetables Healthy for Humans. *PLoS One*, 7, 7.
- Gaylor KR, Sykes GE** (1985) Effects of nutritional stress on the storage proteins of soybeans. *Plant Physiol.*, 78: 582-585.
- Gibson KE, Kobayashi H, Walker GC** (2008) Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu. Rev. Genet.* 42: 413-441.
- Gil-Quintana E, Larrainzar E, Arrese-Igor C, González EM** (2013a) Is N-feedback involved in the inhibition of nitrogen fixation in drought-stressed *Medicago truncatula*? *J. Exp. Bot.* 64: 281-292.
- Gil-Quintana E, Larrainzar E, Seminario A, Díaz-Leal JL, Alamillo JM, Pineda M, Arrese-Igor C, Wienkoop S, González EM** (2013b) Local inhibition of nitrogen fixation and nodule metabolism in drought-stressed soybean. *J. Exp. Bot.* 64: 2171-2182.
- Jimeno V, Syrvestsen JP, Nieves M, Simón I, Martínez V, García-Sánchez F** (2009) Additional nitrogen fertilization affects salt tolerance of lemon trees on different rootstocks. *Sci. Hortic.* 121:298-305.
- Glenn AR, Poole PS, Hudman JF** (1980) Succinate uptake by free-living and bacteroid forms of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 119: 267-271.
- Golden JW, Robinson SJ, Haselkorn R** (1985) Rearrangement of nitrogen-fixation genes during heterocysts differentiation in the *Cyanobacterium Anabaena*. *Nature* 314: 419-423.
- Gonzalez EM, Gordon AJ, James CL, Arrese-Igor C** (1995). The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. *J. Exp. Bot.* 49: 1705-1714
- Gordon AJ** (1995) Sucrose metabolism to support N₂ fixation in legume root nodules. En: *Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications*. IA Tikhonovich, NA Provorov, VI Romanov, WE Newton (Eds) pp. 533-538 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Gordon AJ, Kessler W** (1990) Defoliation-induced stress in nodules of white clover. 2. Immunological and enzymatic measurements of key proteins. *J. Exp. Bot.* 41: 1255-1262.
- Gordon AJ, Minchin FR, James CL, Komina O** (1999) Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. *Plant Phys.* 114: 937-946.
- Gordon AJ, Ryle GJA, Mitchell DF, Powell CE** (1985) The flux of ¹⁴C-labeled photosynthate through soybean root-nodules during N₂ fixation. *J. Exp. Bot.* 36: 756-769.
- Gotor C, García I, Crespo JL, Romero LC** (2013) Sulfide as a signaling molecule in autophagy. *Autophagy* 9: 609-611.
- Gotor C, Romero LC** (2013) S-sulfocysteine synthase function in sensing chloroplast redox status. *Plant Signal. Behav.* 8; doi:10.4161/psb.23313.

- Graham PH, Vance CP** (2000) Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Fields Crops Res.* 65: 93-106.
- Graham PH, Vance CP** (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131: 872-877.
- Groat RG, Vance CP** (1981) Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfalfa (*Medicago sativa* L.): developmental patterns and response to applied nitrogen. *Plant Physiol.* 67: 1198-1203.
- Groten K, Vanacker H, Dutilleul C, Bastian F, Bernard S, Carzaniga R, Foyer CH** (2005) The roles of redox processes in pea nodule development and senescence. *Plant, Cell and Environ.* 28: 1293-1304.
- Grubb CD, Abel S** (2006) Glucosinolate metabolism and its control *Trends Plant Sci.* 2: 89-100.
- Gyaneshwar P, Hirsch AM, Moulin L, Chen WM, Elliot GN, Bontemps C, Estrada-de-los-Santos P, Gross E, Bueno dos Reis Jr. F, Sprent J, Young JPW, James EK** (2011) Legume-nodulating Betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Mol. Plant Microbe Interact.* 247: 1276-1288.
- Haas HF, Queiroz R, Bauer A, Wirtz M, Hell R** (2008) Mitochondrial serine acetyltransferase functions as pacemaker of cysteine synthesis in plant cells. *Plant Physiol.* 148:1055-1067.
- Habtemichael KH, Singh BR, Aune JB** (2007) Wheat response to N₂ fixed by faba bean (*Vicia faba* L.) as affected by sulphur fertilization and rhizobial inoculation in semi-arid southern Ethiopia. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 170, 412-418.
- Hagstrom GR** (1986) Fertilizer sources of sulphur and their use. In: Tabatabai, MA (Ed.) *Sulphur in agriculture*. Agron. Monogr. 27, ASA, CSSA, and SSSA, Madison, WI, pp. 567-581.
- Halliwell B** (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141: 312-322.
- Hardason G** (1994) International FAO/IAEA programmes on biological nitrogen fixation. In: *Symbiotic Nitrogen Fixation*. Eds. Graham PH, Sadowsky MJ, Vance CP. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp. 189-202.
- Hardason G, Atkins C** (2003) Optimising biological N₂ fixation by legumes in farming systems. *Plant Soil* 252: 41-54.
- Harrison J, Jamet A, Muglia CI, Van de Syde G, Aguilar OM, Puppo A, Frendo P** (2005) Glutathione plays a fundamental role in growth and symbiotic capacity of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 187: 168-174.
- Hassen AI, Bopape FL, Habig J, Lamprecht SC** (2012) Nodulation of rooibos (*Aspalathus linearis* Burm. f.), an indigenous South African legume, by members of both the alpha-Proteobacteria and beta-Proteobacteria). *Biol. Fertil. Soils* 48: 295-303.
- Hatzfield Y, Lee S, Lee M, Leustek T, Saito K** (2000) Functional characterization of a gene encoding a fourth ATP sulphurylase isoform from *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 248: 51-58.
- Hauggaard-Nielsen H, Ambus P, Jensen ES** (2001) Interspecific competition, N use and interference with weeds in pea-barley intercropping. *Field Crop. Res.* 70: 101-109.

- Hawkesford MJ and De Kok LJ** (2006) Managing sulphur metabolism in plants. *Plant Cell Environ.* 29: 382-395.
- Hawkesford MJ and De Kok LJ** (2007) Sulphur in plants: an ecological perspective. *Plant Ecophysiology*, vol 6. Ed. Springer, Netherlands. ISBN 678-1-4020-5886-8
- Hawkesford MJ, Howarth JR, Buchner P** (2006) Control of sulphur uptake, assimilation and metabolism. In: *Control of Primary Metabolism in Plants. Annu. Plant Rev.* 22. Plaxton WC and McManus MT, eds. pp 348-372.
- Heeg C, Kruse C, Jost R, Gutensohn M, Ruppert T** (2008) Analysis of the *Arabidopsis* O-acetylserine(thiol)lyase gene family demonstrates compartment-specific differences in the regulation of cysteine synthesis. *Plant Cell* 20: 168-185.
- Hell R** (1997) Molecular physiology of plant sulphur metabolism. *Planta* 202: 935-945.
- Hell R, Kruse C** (2007) Sulphur in biotic interactions of plants. In: Hawkesford MJ, De Kok LJ (eds) *Sulphur in plants—an ecological perspective*. Springer, Dordrecht, The Netherlands. ISBN: 978-1-4020-5886-8. Pp: 197-224.
- Henson CA, Collins M, Duke SH** (1982) Subcelular localization of enzymes of carbon and nitrogen metabolism in nodules of *Medicago sativa*. *Plant Cell Physiol.* 23: 227-235.
- Herr I, Büchler MW** (2010) Dietary constituents of broccoli and other cruciferous vegetables: implications for prevention and therapy of cancer. *Cancer Treat. Rev.* 36:377-83. doi: 10.1016/j.ctrv.2010.01.002.
- Hesse H, Kreft O, Maimann S, Zeh, Höfgen R** (2004a) Current understanding of the regulation of methionine biosynthesis in plants. *J Exp. Bot.* 55: 1799-1808.
- Hesse H, Nikiforova V, Gakière B, Hoefgen R** (2004b) Molecular analysis and control of cysteine biosynthesis: integration of nitrogen and sulphur metabolism. *J. Exp. Bot.* 55: 1283-1292.
- Hirai MY, Fujiwara T, Awazuhara M, Kimura T, Noji M, Saito K** (2003) Global expression profiling of sulphur-starved *Arabidopsis* by DNA macroarray reveals the role of O-acetyl-L-serine as a general regulator of gene expression in response to sulphur nutrition. *Plant J.* 33: 651-663.
- Hirai MY, Saito K** (2008) Analysis of systemic sulphur metabolism in plants using integrated 'omics' strategies. *Mol Biosyst.* 4: 967-973.
- Hodges M, Flesch V, Galvez S, Bismuth E** (2003) Higher plant NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenases, ammonium assimilation and NADPH production. *Plant Physiol. Bioch.* 41: 577-585.
- Hopkins L, Parmar S, Bouranis DL, Howarth JR, Hawkesford MJ** (2004) Coordinated expression of sulphate uptake and components of the sulphate assimilatory pathway in maize. *Plant Biol.* 6: 408-414.
- Horst I, Welhma T, Kelly S, Kaneko T, Sato S, Tabata S, Parniske M, Wang TL** (2007) Tilling mutants of *Lotus japonicus* reveal that nitrogen assimilation and fixation can occur in the absence of nodule-enhanced sucrose synthase. *Plant Physiol.* 144: 806-820.
- Hosie AHF, Allaway D, Galloway CS, Dunsby HA, Poole PS** (2002) *Rhizobium leguminosarum* has a second general amino acid permease with unusual broad substrate specificity and high similarity to branched-chain amino acid transporters (Bra/LIV) of the ABC family. *J. Bacteriol.* 184: 4071-4080.

- Hosie AHF, Allaway D, Jones MA, Walshaw DL, Johnston AWB, Poole PS** (2001) Solute-binding protein-dependent ABC transporters are responsible for solute efflux in addition to solute uptake. *Mol. Microbiol.* 40: 1449-1459.
- Hothorn M, Wachter A, Gromes R, Stuwe T, Rausch T, Scheffzek K.** (2006) Structural basis for the redox control of plant glutamate cysteine ligase. *J. Biol. Chem.* 281: 27557-27565.
- Howitt SM, Udvardi M** (2000) Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *BBA-Biomembranes* 1465: 152-170.
- Huang CY, Boyer JS, Vanderhoef LN** (1975) Limitation of acetylene-reduction (nitrogen-fixation) by photosynthesis in soybean having low water potentials. *Plant Physiol.* 56: 228-232.
- Hullo MF, Auger S, Soutourina O, Barzu O, Yvon M, Danchin A, Martin, Martin-Verstraete I** (2007) Conversion of methionine to cysteine in *Bacillus subtilis* and its regulation. *J. Bacteriol.* 189: 187-197.
- Humbeck C, Werner D** (1989) Delayed nodule development in a succinate transport mutant of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Plant Physiol.* 134. 276 – 283.
- Hungria M, Vargas MAT** (2000) Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops. Res.* 65: 151-164.
- Irar S, González EM, Arrese-Igor C, Marino D** (2014) A proteomic approach reveals new actors of nodule response to drought in split-root grown pea plants. *Physiol. Plantarum*. doi: 10.1111/ppl.12214
- Ikegami F, Kaneko M, Lambein F, Kuo Y-H, Murakoshi I** (1987) Difference between uracilylalanine synthases and cysteine synthases in *Pisum sativum*. *Phytochemistry* 26: 2699-2704.
- James EK, Iannetta PPM, Deeks L, Sprent JI, Minchin FR** (2000) Detopping causes production of intercellular space occlusions in both the cortex and infected region of soybean nodules. *Plant Cell Environ.* 23: 377-386.
- Jenkinson CA** (2001) The impacts of human on the nitrogen cycle, with focus on temperate arable agriculture. *Plant Soil* 228: 3-15.
- Jensen ES, Hauggaard-Nielsen H** (2003) How can increased use of biological N₂ fixation in agriculture benefit the environment? *Plant Soil* 252: 177-186.
- Jiménez A, Hernández JA, Del Rio LA, Sevilla F** (1997) Ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisome of pea leaves: changes induced by leaf senescence. *Phyton-Annales Rei Botanicae* 37: 101-107.
- Johnston AWB, Beringer JE** (1975) Identification of the *Rhizobium* strains in pea root nodules using genetic markers. *J. Gen. Microbiol.* 87: 343-350.
- Jordan DC** (1984) Transfer of *Rhizobium japonicum*, Buchanan 1980, to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plant. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32: 136-139
- Jost R, Altschmied L, Bloem E, BogsJ, Gershenzon J, Hahnel U, Hansch R, Hartmann T, Kopriva S, Kruse C, Mendel RR, Papenbrock J, Reichelt M, Rennenberg H, Schnug E, Schmidt A, Textor S, Tokuhisa J, Wachter A, Wirtz M, Rausch T, Hell R** (2005) Expression profiling of metabolic genes in response to methyl jasmonate reveal regulation

- of genes of primary and secondary sulphur-related pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynth. Res.* 36: 491-508.
- Jost R, Berkowitz O, Wirtz M, Hopkins L, Hawkesford MJ, Hell R** (2000) Genomic and functional characterization of the *oas* gene family encoding O-acetylserine(thiol)lyases, enzymes catalyzing the final step in cysteine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*: 253: 237-247.
- Kalia VC, Drevo JJ** (1985) Variation in nitrogenase activity (C_2H_2 reduction) during in situ incubation of root nodules of *Glycine max* (L.) Merr. C. R. Acad. Sci. Paris III, 301: 591-596.
- Kannan S, Ramani S** (1978) Studies on molybdenum absorption in bean and rice. *Plant Physiol.* 62: 179-181.
- Karunakaran R, Ramachandran V, Seaman J, East A, Mouhsine B, Mauchline T, Prell J, Skeffington A, Poole PS** (2009) Transcriptomic Analysis of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae in symbiosis with host plants *Pisum sativum* and *Vicia cracca*. *J. Bacteriol.* 191: 4002-4014.
- Kataoka T, Watanabe-Takahashi A, Hayashi N, Ohnishi M, Mimura T, Buchner P, Hawkesford MJ, Yamaya T, Takahashi H** (2004) Vacuolar sulphate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulphate in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 2693-2704.
- Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, Trollinger D** (1988) Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene* 70: 191-197.
- Kennedy IR, Choudhury ATMA, Kecskés ML** (2004) Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biol. Biochem.* 36: 1229-1244.
- Kertesz MA** (1999) Riding the sulphur cycle – metabolism of sulfonates and sulphur esters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 135-175.
- Kertesz MA** (2001) Bacterial transporters for sulphate and organosulphur compounds. *Res. Microbiol.* 152: 279-290.
- Klonus D, Riesmeier JW, Willmitzer L** (1995) A cDNA clone for ATP-sulphurylase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 107: 653-654.
- Klose S, Moore JM, Tabatai MA** (1999) Arylsulphatase activity of microbial biomass in soils as affected by cropping systems. *Biol. Fertil. Soils* 29: 46-54.
- Kopriva S, Büchert T, Fritz G, Suter M, Benda R, Schünemann V, Koprivova A, Trautwein AX, Kroneck PMH, Brunold C** (2002) The Presence of an Iron-Sulphur Cluster in Adenosine 5'-Phosphosulphate Reductase Separates Organisms Utilizing Adenosine 5'-Phosphosulphate and Phosphoadenosine 5'-Phosphosulphate for Sulphate Assimilation. *J Biol Chem* 24: 21786-21791.
- Kopriva S, Rennenberg H** (2004) Control of sulphate assimilation and glutathione synthesis: interaction with N and C metabolism. *J. Exp. Bot.* 55: 1831-1842.
- Koprivova A, North KA, Kopriva S** (2008) Complex signaling network in regulation of adenosine 5'-phosphosulphate reductase by salt stress in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.* 146: 1408-1420.

- Koprivova A, Suter M, Op den Camp R, Brunold C, Kopriva S** (2000) Regulation of sulphate assimilation by nitrogen in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122: 737-746.
- Kotkova B, Balik J, Cerny J, Kulkanek M, Bazalova M** (2008) Crop influence on mobile sulphur content and arylsulphatase activity in the plant rhizosphere. *Plant Soil Environ.* 54: 100-107.
- Kredich NM** (1987) Biosynthesis of cysteine, pp 419-428. In: “*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology”, 1st ed., vol 1. Neidhart FC, Ingraham JL, Low KB, Maganasik B, Schaechter M, Umberger HE (eds). American Society for Microbiology, Washington DC.
- Krueger RJ and Siegel LM** (1982) Evidence for siroheme-Fe₄S₄ interaction in spinach ferredoxin-sulphite reductase. *Biochemistry* 21: 2905-2909.
- Krueger S, Niehl A, Lopez-Martín MC, Steinhauser D, Dinath A, Hildebrandt T, Romero LC, Hesse H, Gotor C** (2009) Analysis of cytosolic and plastidic serine acetyltransferase mutants and subcellular metabolite distributions suggests interplay of the cellular compartments for cysteine biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 32: 349-367.
- Krussell L, Krause K, Ott T, Desbrosses G, Kramer U, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, James EK, Sandal N, Stougaard J, Kawaguchi M, Miyamoto A, Suganuma N, Udvardi MK** (2005). The sulphate transporter SST1 is crucial for symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus* root nodules. *Plant Cell* 17: 1625-1636.
- Labhili M, Joudrier P, Gautier MF** (1995) Characterization of cDNAs encoding *Triticum durum* dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. *Plant Science* 112: 219-230.
- Ladrera R** (2007) Modelos de regulación de la fijación de nitrógeno en respuesta a sequía: soja y *Medicago*. Tesis Doctoral. Universidad Pública de Navarra
- Ladrera R, Marino D, Larrainzar E, Gonzalez EM, Arrese-Igor C** (2007) Reduced carbón availability to bacteroids and elevated ureides in nodules, but not in shoots, are involved in the nitrogen fixation response to early drought in soybean. *Plant Physiol.* 145: 539-546.
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lagueree G, Mazurier SI, Amarger N** (1992) Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations. *FEMS Microbiology Ecology.* 101: 17-26.
- Lange A** (1998) Influence of sulphur supply on N₂ fixation of legumes. (PhD Thesis). Univ Bonn, Germany.
- Larrainzar E, Molenaar JA, Wienkoop S, Gil-Quintana E, Alibert B, Limami A, Arrese-Igor C, González EM** (2014) Drought stress provokes the down-regulation of methionine and ethylene biosynthesis pathways in *Medicago truncatula* roots and nodules. *Plant, Cell Environ.* 37: 2051-2063.
- Larrainzar E, Wienkoop S, Scherling C, Kempa S, Ladrera R, Arrese-Igor C, Weckwert W, González EM** (2009) Carbon metabolism and bacteroid functioning are involved in the regulation of nitrogen fixation in *Medicago truncatula* under drought and recovery. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22: 1565-1576.

- Larrainzar E, Wienkoop S, Weckwert W, Ladrera R, Arrese-Igor C, Gonzalez EM** (2007) *Medicago truncatula* root nodule proteome analysis reveals differential plant and bacteroid responses to drought stress. *Plant Physiol.* 144: 1495-1507.
- Le Roux MR, Khan S, Valentine AJ** (2008) Organic acid accumulation may inhibit N₂ fixation on phosphorous-stressed lupin nodules. *New Phytol.* 177:956-964.
- Leustek T, Martin MN, Bick JA, Davies JP** (2000) Pathways and regulation of sulphur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 51: 141-165.
- Lewandowska M, Sirko A** (2008) Recent advances in understanding response to sulphur-deficiency stress. *Acta Biochimica Polonica* 55: 457-471.
- Limpens E, Franken C, Smit P, Willemse J, Bisseling T, Geurts R** (2003) LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* 302: 630-633.
- Ling S, Chen X, Zhu Y** (2005) *P. sativum* mRNA for elongation factor 1-alpha (Accession No X96555)
- Lisjak M, Teklic T, Wilson ID, Whiteman M, Hancock JT** (2013) Hydrogen sulfide: environmental factor or signaling molecule? *Plant Cell Environ.* 36: 1607-1616.
- Lodwig EM, Hosie AHF, Bordes A, Findlay K, Allaway D, Karunakaran R, Downie JA, Poole PS** (2003) Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume - *Rhizobium* symbiosis. *Nature* 422: 722-726.
- Lodwig EM, Poole PS** (2003) Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. *Crit. Rev. Plant Sci.* 22: 37-78.
- Long SR** (1996) *Rhizobium* symbiosis: Nod factors in perspective. *Plant Cell* 8: 1885-1898.
- Lopez-Bellido L** (2006) El papel de las leguminosas en la sostenibilidad de la agricultura mediterránea: ilusión o realidad. *Nuevos retos y oportunidades de las leguminosas en el sector agroalimentario español*. Ed. De los Mozos M, Jiménez MJ, Rodríguez MF, Sánchez R. Consejería de Agricultura. Junta de Comunidades de Castilla-la Mancha. 29-50.
- Lum MR, Hirsch AM** (2003) Roots and their symbiotic microbes: strategies to obtain nitrogen and phosphorous in a nutrient-limiting environment. *J. Plant Growth Regul.* 21:368-382.
- Lunn JE, Droux M, Martin J, Douce R** (1990) Localization of ATP-sulphurylase and O-acetylserine(thiol)lyase in spinach leaves. *Plant Physiol.* 94: 1345-1352.
- MacRae JC** (1971) Quantitative measurement of starch in very small amounts of leaf tissue. *Planta* 96: 101-108
- Madigan MT, Brock TD, Martinko JM, Parker J** (2008) Brock. Biología de los Microorganismos. 11th edition. Pearson Education International Inc., New Jersey. ISBN: 0131968939
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J, Sánchez-Pérez M** (2003) Brock. Biología de los microorganismos. Pearson Educación, Príncipe Hall, Madrid. 10^a edición.
- Maldonado JM, Agüera E, Pérez-Vicente R** (2000) Asimilación del nitrógeno y del azufre. In: Azcón-Bieto J, M Talón, eds. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. McGraw-Hill Interamericana de España, SAU, Madrid; pp: 235-246.

- Marino D** (2006) Procesos implicados en la regulación de la fijación de nitrógeno en leguminosas bajo estrés hídrico provocado por sequía o paraquat. Tesis Doctoral. Universidad Pública de Navarra.
- Marino D, Gonzalez EM, Arrese-Igor C** (2006). Drought effects of carbon and nitrogen metabolism of pea nodules can be mimicked by paraquat: evidence for the occurrence of two regulation pathways under oxidative stresses. *J. Exp. Bot.* 57: 665-673.
- Marino D, González EM, Frendo P, Puppo A, Arrese-Igor C** (2007) NADPH recycling system in oxidative stressed pea nodules: a key role for the NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. *Planta* 225: 413-421.
- Marino D, Hohnjec N, Küster H, Moran JF, González EM, Arrese-Igor C** (2008) Evidence for transcriptional and post-translational regulation of sucrose synthase in pea nodules by the cellular redox state. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21: 622-630.
- Marschner H, Kirkby EA, Cakmak I** (1996) Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *J. Exp. Bot.* 47: 1255-1263.
- Matamoros MA, Baird LM, Escuredo PR, Dalton DA, Minchin FR, Iturbe-Ormaetxe I, Rubio MC, Moran JF, Gordon AJ, Becana M** (1999) Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical and structural alterations. *Plant Physiol.* 121: 97-112.
- Matamoros MA, Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I, Rubio MC, Becana M** (1999) Glutathione and homoglutathione synthesis in legume root nodules. *Plant Physiol.* 121: 879-888.
- Maxted N, Ambrose M** (2001) Peas (*Pisum* L.) In: *Plant Genetic Resources in the Mediterranean*. Maxted N, Bennet SJ, eds. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. ISBN: 0-7923-6707-3. pp 181-190
- McGrath SP, Zhao FJ, Blake-Kalff, MM** (2002) *History and outlook for sulphur fertilizers in Europe*. Proc. No. 497, International Fertiliser Society, York, UK.
- McGrath SP, Zhao FJ, Withers PJA** (1996) Development of sulphur deficiency in crops and its treatment. *Proceedings of the Fertiliser Society No. 379. The Fertiliser Society, Peterborough, UK.*
- Meeks JC** (1998) Symbiosis between nitrogen-fixing cyanobacteria and plants. *Bioscience* 48: 266-276.
- Meyer AJ and Hell R** (2005) Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynthesis Research* 86: 435-457.
- Michiels J, Dombretch B, Vermeiren N, Xi CW, Luyten E, Vanderleyden J** (1998) *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26: 193-205.
- Miller JH** (1972) Experiments on Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, CHS, New York
- Miller RW, McRae DG, Joy K** (1991) Glutamate and gamma-aminobutyrate metabolism in isolated *Rhizobium meliloti* bacteroids. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4: 37-45.
- Minchin FR** (1997) Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. *Soil Biol. Biochem.* 29: 881-888.

- Mirleau P, Wogelius R, Smith A, Kertesz MA** (2005) Importance of organosulphur utilization for survival of *Pseudomonas putida* in soil and rhizosphere. *Appl Environ Microb* 71: 6571-6577.
- Molero G, Aranjuelo I, Teixidor P, Araus JL, Nogués S** (2011) Measurement of ^{13}C and ^{15}N isotope labeling by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry to study amino acid fluxes in a plant-microbe symbiotic association. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25:599-607.
- Molvig L, Tabe LM, Eggum BO, Moore AE, Craig S, Spencer D, Higgins TJ** (1997) Enhanced methionine levels and increased nutritive value of seeds of transgenic lupins (*Lupinus angustifolius* L.) expressing a sunflower seed albumin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 8393-8398.
- Monti L** (1983) Natural and induced variability in peas for protein production. In: Perspectives for peas and lupins as protein crops. Thompson R., Casey R. (Eds.). Martinus Nijhoff publishers, The Hague, Boston, London, pp: 22-39.
- Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I, Matamoros MA, Rubio MC, Clemente MR, Brewin NJ, Becana M** (2000) Glutathione and homoglutathione synthetases of legume nodules. Cloning, expression and subcellular localization. *Plant Physiol.* 124: 1381-1392.
- Moulin L, Munive A, Dreyfus B, Boivin-Masson C** (2001) Nodulation of legumes by members on the β -subclass of Proteobacteria. *Nature* 411: 948-950.
- Mpepereki S, Makonese F, Gillet DE** (2002) Soybean N_2 fixation and food security for smallholder farmers: a research-extension model for Sub-Saharan Africa. In: *Nitrogen Fixation: Global Perspectives. Proceedings of the 13th International Congress on Nitrogen Fixation*. Eds. Finan TM, O'Brian MR, Layzell DB, Vessey JK, Newton W. CABI Publishing Series, Wallingford, UK.
- Muglia I, Comai G, Spegazzini E, Riccillo PM, Aguilar OM** (2008) Glutathione produced by *Rhizobium tropici* is important to prevent early senescence in common bean nodules. *FEMS Microbiol. Lett.* 286: 191-198.
- Muttucumaru N, Powers SJ, Elmore JS, Mottram DS, Halford N** (2013) Effects of nitrogen and sulphur fertilization on free amino acids, sugars, and acrylamide-forming potential in potato. *J. Agric. Food Chem.* 61: 6734-6742.
- Nakagawa T, Izumi T, Banba M, Umehara Y, Kouchi H, Izui K, Hata S** (2003) Characterization and expression analysis of genes encoding phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase kinase of *Lotus japonicus*, a model legume. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16: 281 – 288.
- Nakayama M, Akashi T, Hase T** (2000) Plant sulphite reductase: molecular structure, catalytic function and interaction with ferredoxin. *J. Inorg. Biochem.* 82: 27-32.
- Narayan VS and Nair PS** (1990) Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher-plants. *Phytochemistry* 29: 367-375.
- Naya L, Ladrera R, Ramos J, González EM, Arrese-Igor C, Minchin FR, Becana M** (2007) The response of carbon metabolism and antioxidant defenses of alfalfa nodules to drought stress and to the subsequent recovery of plants. *Plant Physiol.* 144: 1104-1114.
- Newton GL, Dorian R, Fahey RC** (1981) Analysis of biological thiols: derivatization with monobromobimane and separation by reverse-phase high performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 114: 383-387

- Newton WE** (2000) Nitrogen fixation in perspective. In: FO Pedrosa, M Hungria, MG Yates, WE Newton, eds, Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Vol. 38. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 3-8.
- Ng B, Anderson J** (1978) Chloroplast cysteine synthases of *Trifolium repens* and *Pisum sativum*. *Phytochemistry* 17: 879-885.
- Nikiforova VJ, Kopka J, Tolstikov V, Fiehn O, Hopkins L, Hawkesford MJ, Hesse H, Hoefgen R** (2005) Systems rebalancing of metabolism in response to sulphur deprivation, as revealed by metabolome analysis of Arabidopsis plants. *Plant Physiol.* 138: 304-318.
- Noctor G, Arisi A-CM, Jouanin L, Kunert KJ, Rennenberg H, Foyer CH** (1998) Glutathione : biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J. Exp. Bot.* 49: 623-647.
- Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH** (2002) Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J. Exp. Bot.* 53: 1283-1304.
- North KA, Kopriva S** (2007) Sulphur in resistance to environmental stresses. In: Hawkesford MJ, De Kok LJ (eds) *Sulphur in plants—an ecological perspective*. Springer, Dordrecht, The Netherlands. ISBN: 978-1-4020-5886-8; pp: 143-168.
- Novero AU, Ford R** (2010) The influence of sulphur limitation on expression levels of an O-acetylserine(thiol)lyase gene from *Vicia sativa*. *Biol. Plantarum* 54: 579-582.
- Novero AU, Taylor PWJ, Ford R** (2008) Isolation and characterization of O-acetylserine(thiol)lyase, and enzyme of the cysteine biosynthetic pathway of vetch (*Vicia sativa* L) *Austral. J. Crop Sci.* 2: 96-104.
- O' Hara GW** (2001) Nutritional constraints on root nodule bacteria affecting symbiotic nitrogen fixation: a review. *Aust. J. Exp. Agric.* 41:417-433.
- O'Hara GW, Howieson JG, Graham PH** (2002) Nitrogen fixation and agricultural practice. En: *Nitrogen Fixation at the Millennium*. Ed. Leigh GJ. Elsevier Science BV. Amsterdam pp 391-420.
- Okpodu CM, Alscher RG, Grabau EA, Cramer CL** (1996) Physiological, biochemical and molecular effects of sulphur dioxide. *J. Plant Physiol.* 148: 309-316.
- Oldroyd GED, Downie JA** (2004) Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 566-576.
- Oldroyd GED, Downie JA** (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 519-546.
- Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA** (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* 45: 119-144.
- Olivares J, Bedmar EJ, Sanjuán J** (2013) Biological nitrogen fixation in the context of global change. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26: 486-494)
- Pacyna S, Schulz M, Scherer HW** (2006) Influence of sulphur supply on glucose and ATP concentrations of inoculated broad beans (*Vicia faba minor* L.). *Biol. Fert. Soils* 42: 324-329.
- Paek NC, Imsande J, Shoemaker RC, Shibles R** (1997) Nutritional control of soybean seed storage protein. *Crop Sci.* 37: 498-503.

- Pajuelo E, Carrasco JA, Romero LC, Chamber MA, Gotor C** (2007) Evaluation of the metal phytoextraction potential of crop legumes. Regulation of the expression of O-acetylserine(thiol)lyase under metal stress. *Plant Biol.* 9: 672-681.
- Palmer KM, Young JPW** (2000) Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae populations in arable soils than in grass soils. *Appl. and Environ. Microbiol.* 66, 2445-2450.
- Parker G, Walshaw D, O'Rourke K, Broad S, Tingey A, Poole PS, Robson RL** (2001) Evidence for redundancy in cysteine biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum* RL3841: analysis of a *cysE* gene encoding serine acetyltransferase. *Microbiology* 147: 2553-2560.
- Parniske M** (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 763-775.
- Patriarca EJ, Tate R, Iaccarino M** (2002) Key role of bacterial NH_4^+ metabolism in *rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 203-222.
- Patron NJ, Durnford DG, Kopriva S** (2008) Sulphate assimilation in eukaryotes: fusions, relocations and lateral transfers. *BMC Evol Biol* 8: 39.
- Pauly N, Pucciarello C, Mandon K, Innocenti G, Jamet A, Baudouin E, Herouart D, Frendo P, and Puppo A** (2006) Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: Key players in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *J. Exp. Bot.* 57: 1769-1776.
- Peoples MB, Bowman AM, Gault RR, Herridge DF, Mccallum MH, McCormick KM, Norton RM, Rochester IJ, Scammell GJ, Schwenke GD** (2001) Factors regulating the contributions of fixed nitrogen by pasture and crop legumes to different farming systems in eastern Australia. *Plant Soil* 228: 29-41.
- Peoples MB, Herridge DF, Ladha JK** (1995) Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. *Plant Soil* 174: 3-28.
- Peoples MB, Ladha JK, Herridge DF** (1995b) Enhancing legume N_2 fixation through plant and soil management. *Plant Soil* 174: 83-102.
- Perret X, Staehelin C, Broughton WJ** (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 180-201.
- Peuke AD, Hartung W, Jeschke WD** (1994). The uptake and flow of C, N and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L. II. Grown with low or high nitrate supply. *J. Exp. Bot.* 45: 733-740.
- Phartiyal P, Kim WS, Cahoon RE, Jez JM, Krishnan HB** (2006) Soybean ATP sulphurylase, a homodimeric enzyme involved in sulphur assimilation, is abundantly expressed in roots and induced by cold treatment. *Arch. Biochem. Biophys.* 450: 20-29.
- Phelps AS, Wilson PW** (1941) Occurrence of hydrogenase in nitrogen-fixing organisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 47: 473-476
- Poole PS, Blyth A, Reid C, Walters K** (1994) *myo*-Inositol catabolism and catabolite regulation in *Rhizobium leguminosarum* bv viciae. *Microbiology* 140: 2787-2795.
- Poole PS, Franklin M, Glenn AR, Dilworth MJ** (1985) The transport of L-glutamate by *Rhizobium leguminosarum* involves a common amino acid carrier. *J. Gen. Microbiol.* 131: 1441-1448.
- Prell J, Bourdès A, Karunakaran R, Lopez-Gomez M, Poole PS** (2009) Pathway of γ -aminobutyrate metabolism in *Rhizobium leguminosarum* 3841 and its role in symbiosis. *J. Bacteriol.* 191: 2177-2186.

- Prell J, Bourdès A, Kumar S, Lodwig E, Hoise A, Kinghorn S, White J, Poole PS** (2010) Role of symbiotic auxotrophy in the *Rhizobium*-legume symbioses. *PLoS One* 5, e13933.
- Prell J, Poole PS** (2006) Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol.* 14: 161-168
- Prell J, White JP, Bourdes A, Bunnewell S, Bongaerts RJ, Poole PS** (2009) Legumes regulate *Rhizobium* bacteroid development and persistence by the supply of branched-chain amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 30: 12477-12482.
- Price CA** (1957) A new thiol in legumes. *Nature* 180: 148-149.
- Pueppke SG, Broughton WJ** (1999) *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 293-318.
- Purcell LC, Sinclair TR** (1994) An osmotic hypothesis for the regulation of oxygen permeability in soybean nodules. *Plant Cell Environ.* 17: 837-843.
- Purves WK, Sadava D, Orians GH, Heller HC** (1995) *Life: The Science of Biology*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, EEUU.
- Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Felle HH, Umehara Y** (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two Lys M receptor-like kinases. *Nature* 425: 585-592.
- Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Jurkiewicz A, Fukai E, Quistgaard EMH, Albrechtsen AS, James EK, Thirup S, Stougaard J** (2007) LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range. *EMBO J.* 26: 3923-3935.
- Rainbird MR, Hitz WD, Hardy WF** (1984) Experimental determination of the respiration associated with soybean/*Rhizobium* nitrogenase function, nodule maintenance, and total nodule nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 75: 49-53.
- Ramos A** (1988) El cultivo del guisante proteaginoso y su utilización. El campo. Boletín de Información Agraria 108: 61-69.
- Ratajczak L, Ratajczak W, Koroniak D** (1989). Detection of nodule specific forms of malate dehydrogenase from root nodules of *Lupinus luteus*. *Biochemical Physiology.* 184: 243-248.
- Rausch T, Wachter A** (2005) Sulphur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends Plant Sci.* 10: 503-509.
- Rausser WE** (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochem. Biophys.* 31: 19-48.
- Rausser WE, Schupp R and Rennenberg H** (1991) Cysteine, gamma-Glutamylcysteine, and Glutathione Levels in Maize Seedlings: Distribution and Translocation in Normal and Cadmium-Exposed Plants. *Plant Physiol.* 97: 128-138.
- Ravina CG, Barroso C, Vega JM, Gotor C** (1999) Cysteine biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* – molecular cloning and regulation of O-acetylserine(thiol)lyase *Eur. J. Biochem* 264: 848-853.
- Rigaud J, Puppo A** (1975) Indole-3-acetic-acidcatabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 88: 223-228.
- Roje S** (2006) S-adenosyl-L-metionine: beyond the universal methyl group donor. *Phytochemistry* 67: 1686-1698.

- Romero LC, Aroca MA, Laureano-Marín AM, Moreno I, García I, Gotor C** (2014) Cysteine and cysteine-related signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 7: 234-276.
- Romero LC, García I, Gotor C** (2013) L-cysteine desulhydrase 1 modulates the generation of the signaling molecule sulfide in plant cytosol. *Plant Signal. Behav.* 8: e24007. doi: 10.4161/psb.24007
- Rosendahl L, Dilworth MJ, Glenn AR** (1992) Exchange of metabolites across the peribacteroid membrane in pea root nodules. *J. Plant Physiol.* 139: 635-638.
- Rosendahl L, Mouritzen P, Rudbeck A** (2001) Nitrogen transfer in the interface between the symbionts in pea root nodules. *Plant Soil* 230: 31-37.
- Rosendahl L, Vance CP, Pedersen WB** (1990) Products of dark CO₂ fixation in pea root-nodules support bacteroid metabolism. *Plant Physiol.* 93: 12-19.
- Roy Davies D** (1995) Peas: *Pisum sativum* (Leguminosae-Papilionoidae). In: Evolution of crop plants. Smartt J, Simmonds NW, eds. 2nd edition. Longman Group. Harlow, Essex. pp. 294-296
- Royuela M, Gonzalez A, Arrese-Igor C, Aparicio-Tejo PM, Gonzalez-Murua C** (1998) Imazethapyr inhibition of acetolactate synthase in *Rhizobium* and its symbiosis with pea. *Pesticide Science* 52: 372-380
- Rudbeck A, Mouritzen P, Rosendahl L** (1999) Characterization of aspartate transport across the symbiosome membrane in pea root nodules. *J. Plant Physiol.* 155: 576-583.
- Ruiz JM Brunwald E** (2002) Salinity-induced glutathione synthesis in *Brassica napus*. *Planta* 214: 965-969.
- Sadowsky MJ, Graham PH** (1998) Soil biology of the *Rhizobiaceae*. In: *The Rhizobiaceae*. Eds. Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJ. Kluwer. Dordrecht. pp 155-172
- Saha and Vandemark GJ** (2012) Evaluation of expression stability of candidate reference genes among green and yellow pea cultivars (*Pisum sativum* L.) subjected to abiotic and biotic stress. *Am. J. Plant Sci.* 3: 235-242.
- Saharan BS, Nehra V** (2011) Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci. Med. Res.* 21: 1-30.
- Saito K** (2004) Sulphur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant Physiol.* 136: 2443-2450.
- Salminen SO and Streeter JG** (1992) Labeling of carbon pools in *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* bacteroids following incubation of intact nodules with ¹⁴CO₂. *Plant Physiol.* 100: 597-604.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sambrook J, Russell** (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sánchez-Echániz J, Benito-Fernández J, Mintegui-Raso S** (2001) Methemoglobinemia and consumption of vegetables in infants. *Pediatrics* 107: 1024-1028.
- Santi C, Bogusz D, Franche C** (2013) Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Ann. Bot.* 111: 743-767.

- Schafer A, Tauch A, Jager W, Kalinowski J, Thierbach G, Puhler A** (1994) Small mobilizable multipurpose vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19 – selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145: 69-73.
- Scharff AM, Egsgaard H, Hansen PE, Rosendahl L** (2003) Exploring symbiotic nitrogen fixation and assimilation in pea nodules by *in vivo* ^{15}N nuclear magnetic resonance spectroscopy and liquid chromatography mass spectrometry. *Plant Physiol.* 131: 367-378.
- Schereer U, Haensch R, Mendel RR, Kopriva S, Rennenberg H, Herschbach C** (2010) Sulphur flux through the 1 sulphate assimilation pathway is differently controlled by adenosine 5'-phosphosulphate reductase under stress and in transgenic poplar overexpressing y-ECS, SO or APR. *J. Exp. Bot.* 61: 609-622.
- Scherer HW** (2001) Sulphur in crop production – invited paper. *Eur. J. Agron.* 14: 81-111.
- Scherer HW** (2009) Sulphur in soils. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 172: 326-335.
- Scherer HW, Lange A** (1996) N_2 fixation and growth of legumes as affected by sulphur fertilization. *Biol. Fertil. Soils* 23: 449-453.
- Scherer HW, Pacyna S, Manthey N, Schulz M** (2006) Sulphur supply to peas (*Pisum sativum* L.) influences symbiotic N_2 fixation. *Plant Soil Environ.* 52:72-77.
- Scherer HW, Pacyna S, Spoth KR, Schulz M** (2008) Low levels of ferredoxin, ATP and leghemoglobin contribute to limited N_2 fixation of peas (*Pisum sativum* L.) and alfalfa (*Medicago sativa* L.) under S deficiency conditions. *Biol Fertil. Soils* 44: 909-916.
- Schlesinger WH** (1997) Biogeochemistry: an analysis of global change. 2nd Ed. Academic Press, San Diego, CA.
- Scholander PF, Bradstreet ED, Hemmingsen EA, Hammel HT** (1965) Sap pressure in vascular plants: negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science* 148: 339–346
- Schonhof I, Blankenburg D, Müller S, Krumbein A** (2007) Sulphur and nitrogen supply influence growth, product appearance, and glucosinolate concentration of broccoli. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 170: 65-72.
- Schubert A, Allara P, Morte A** (2003) Cleavage of sucrose in roots of soybean (*Glycine max*) colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.* 161: 495-501.
- Schubert KR** (1986) Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 37: 539-574.
- Schulze J, Drevon JJ** (2005) P-deficiency increases the O_2 uptake per N_2 in alfalfa. *J. Exp. Bot.* 56: 1779-1784.
- Schulze M, Kondorosi A** (1998) Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu. Rev. Genet.* 32: 33-57.
- Schwedock J, Long SR** (1992) *Rhizobium meliloti* genes involved in sulphate activation: two copies of *nodPQ* and a new locus *saa*. *Genetics* 132: 899-909.
- Serraj R, Shelp BJ, Sinclair TR** (1998) Accumulation of γ -aminobutyric acid in nodulated soybean in response to drought stress. *Physiol. Plant* 102: 79-86.
- Serraj R, Sinclair TR, Purcell LC** (1999) Symbiotic N_2 fixation response to drought. *J. Exp. Bot.* 50: 143-155

- Sexton PJ, Batchelor, WD, Shibles R** (1997) Sulphur availability, rubisco content, and photosynthetic rate of soybean. *Crop Sci.* 37: 1801-1806.
- Shaw SL, Long SR** (2004) Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells. *Plant Phys.* 131: 976-984.
- Sirko A, Gotor C** (2007) Molecular links between toxic metals in the environment and plant sulphur metabolism. In: Hawkesford MJ, De Kok LJ (eds) *Sulphur in plants—an ecological perspective*. Springer, Dordrecht, The Netherlands. ISBN: 978-1-4020-5886-8; pp: 169-195.
- Sirko A, Hryniewicz M, Hulanicka D, Böck A** (1990) Sulphate and thiosulphate transport in *Escherichia coli* K-12: nucleotide sequence and expression of the *cysTWAM* cluster. *J. Bacteriol.* 172: 3351-3357.
- Smith BE** (2002) Nitrogenase reveals its inner secrets. *Science* 297: 1654-1655.
- Smith FW, Hawkesford MJ, Ealing PM, Clarkson DT, Van den Berg PJ, Belcher AR, Warrilow AGS** (1997) Regulation of expression of a cDNA from barley roots encoding a high affinity sulphate transporter. *Plant J.* 12: 875-884.
- Smith IK** (1972) Studies of L-cysteine biosynthetic enzymes in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 50: 477-479.
- Smith IK** (1980) Regulation of sulphate assimilation in tobacco cells: effect of nitrogen and sulphur nutrition on sulphate permease and O-acetylserine sulfhydrylase. *Plant Physiol.* 66: 877-883.
- Smith RL, Smith TM** (2001) Ecology and field biology. Benjamin Cummings, San Francisco.
- Spaink HP, Weinman J, Djordjevic MA, Wijffelman CA, Okker RJH, Lugtenberg BJJ** (1989) Genetic-analysis and cellular-localization of the *Rhizobium* host-specificity-determining node protein. *EMBO J.* 8: 2811-2818.
- Sprent JI** (2001) Nodulation in legumes. Royal Botanic Gardens, Kew. ISBN 1-84646-0137
- Steenhoudt O, Vanderleyden J** (2000) *Azospirillum*, a free-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 487-506.
- Stern DI** (2005) Global sulphur emissions from 1850 to 2000. *Chemosphere* 58: 163-175.
- Streeter JG** (1987) Carbohydrate, organic acid and amino acid composition of bacteroid and citosol from soybean nodules. *Plant Physiol.* 85: 768-773.
- Streeter JG, Thompson JF** (1972). In vivo and in vitro studies on γ -aminobutyric acid metabolism with the radish plant (*Raphanus sativus* L.). *Plant Physiol.* 49: 579-584.
- Sturm A, Lienhard S, Schatt S, Hardegger M** (1999) Tissue-specific expression of two genes for sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Mol. Biol.* 39: 349-360.
- Sugawara M, Shah RG, Sadowsky MJ, Paliy O, Speck J, Wail AW, Gyaneswhwar P** (2011) Expression and functional roles of *Bradyrhizobium japonicum* genes involved in the utilization of inorganic sulphur compounds in free-living and symbiotic conditions. *Mol. Plant Microbe In.* 24: 451-457.
- Sy A, Giraud E, Jourand P, Garcia N, Willems A, de Lajudie P, Prin Y, Neyra M, Gillis M, Boivin-Masson C, Dreyfus B** (2001) Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.* 183: 214-220.

- Tabé L, Wirtz M, Molvig L, Droux M, Hell R** (2010) Overexpression of serine acetyltransferase produced large increases in O-acetylserine and free cysteine in developing seed of a grain legume. *J. Exp. Bot.* 61: 721-733.
- Taiz L, Zeiger E** (2002) Plant Physiology. 3rd Ed. Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA (EEUU).
- Takahashi H** (2010) Regulation of sulphate transport and assimilation in plants. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 281: 129-159.
- Takahashi H, Kopriva S, Giordano M, Saito K, Hell R** (2011) Sulphur assimilation in photosynthetic organisms: molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62: 157-184.
- Takahashi H, Saito K** (1996) Subcellular localization of spinach cysteine synthase isoforms and regulation of their gene expression by nitrogen and sulphur. *Plant Physiol.* 112: 273-280.
- Takahashi H, Yamazaki M, Sasakura N, watanabe A, Leustek T, Engler JA, Engler G, Van Montagu M, Saito K** (1997) Regulation of sulphur assimilation in higher plants: a sulphate transporter induced in sulphate-starved roots plays a central role in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 94: 11102-11107.
- Talbi C, Sanchez C, Hidalgo-Garcia A, Gonzalez EM, Arrese-Igor C, Girard L, Bedmar EJ, Delgado MJ** (2012). Enhanced expression of *Rhizobium etli* cbb₃ oxidase improves drought tolerance of common bean symbiotic nitrogen fixation. *J. Exp. Bot.* 63: 5035-5043.
- Tan Q, Zhang L, Grant J, Cooper P, Tegeder M** (2010) Increased phloem transport of S-methylmethionine positively affects sulphur and nitrogen metabolism and seed development in pea plants. *Plant Physiol.* 154: 1886-1896.
- Taté R, Riccio A, Caputo E, Iaccarino M, Patriarca EJ** (1999) The *Rhizobium etli* metZ gene is essential for methionine biosynthesis and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12: 24-34.
- Taté R, Riccio A, Iaccarino M, Patriarca EJ** (1997) A *cysG* mutant strain of *Rhizobium etli* pleiotropically defective in sulphate and nitrate assimilation. *J. Bacteriol.* 179: 7343-7350.
- Taté R, Riccio A, Merrick M, Patriarca EJ** (1998) The *Rhizobium etli* amtB gene coding for an NH₄⁺ transporter is down-regulated early during bacteroid differentiation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11: 188-198.
- Tate RL** (1995) *Soil Microbiology (symbiotic nitrogen fixation)*. John Wiley & Sons, Inc. New York. Pp 307-333.
- Terpolilli JJ, Hood GH, Poole PS** (2012) What determines the efficiency of N₂-fixing *Rhizobium*-legume symbioses? *Adv. Microb. Physiol.* 60: 325-389.
- Thomas D, Surdin-Kerjan Y** (1997) Metabolism of sulphur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 503-532.
- Thomas J** (1970) Absence of pigments of photosystem-II of photosynthesis in heterocysts of a blue-green alga. *Nature* 228: 181-183.
- Thorndyke J** (1983) The making of the sugar snap pea. *Horticulture* 61: 14-15.
- Thornley JHM** (1972) A balanced quantitative model for shoot: root ratios in vegetative plants. *Ann. Bot.* 36: 431-441.

- Tjepkema JD and Yocum CS** (1974) Measurement of oxygen partial pressure within soybean nodules by oxygen microelectrodes. *Planta* 119: 351-360.
- Trepp GB, Plank DW, Gantt JS, Vance CP** (1999) NADH-glutamate synthase in alfalfa root nodules. Immunocytochemical localization. *Plant Physiol.* 119: 829-837.
- Trinick MJ, Dilworth MJ, Grounds M** (1976) Factors affecting the reduction of acetylene by root nodules of *Lupinus* species. *New Phytol.* 77: 359-370.
- Triplett EW and Sadowsky MJ** (1992) Genetics of competitions for nodulation in legumes. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 399-428.
- Udvardi M and Poole PS** (2013) Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64: 781-805.
- Udvardi MK, Day DA** (1997) Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol.* 48: 493-523.
- Udvardi MK, Lister DL, Day DA** (1991) ATPase activity and anion transport across the peribacteroid membrane of isolated soybean symbiosomes. *Arch. Microbiol.* 156: 362-366.
- Vadez V, Sinclair TR** (2000) Ureide degradation pathways in intact soybean leaves. *J. Exp. Bot.* 51: 153-159.
- Valverde A, Velazquez E, Gutierrez C, Cervantes E, Ventosa A, Igual J** (2003) *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1979-1983.
- Van der Hoorn RAL, Leeuwenburgh MA, Bogyo M, Joosten MH, Peck SC** (2004) Activity profiling of papain-like cysteine proteases in plants. *Plant Physiol.* 135: 1170-1178.
- Van der Ploeg JR, Eichhorn E, Leisinger T** (2001) Sulfonate-sulphur metabolism and its assimilation in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol.* 176: 1-8.
- Van Hove C, Lejeune A** (2002) Applied aspects of *Azolla-Anabaena* simbiosis. In: Rai AN, Bergman B, Rasmussen U, eds. *Cyanobacteria in symbiosis*. Dordrecht: Kluwer, 179-193.
- Van Rhijn P, Goldberg RB, Hirsch AM** (1998) *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. *Plant Cell* 10: 1233-1249.
- Vance CP** (1998) Agronomy and ecology of nitrogen fixation. En: *Perspectivas de la Fijación Biológica de Nitrógeno en el umbral del siglo XXI*. VIII Reunión nacional de Fijación de Nitrógeno. Ed. C Arrese-Igor, M Royuela, PMA Tejo. Universidad Pública de Navarra, Pamplona, pp 27-33.
- Vance CP, Gantt JS** (1992) Control of nitrogen and carbon metabolism in root nodules. *Physiol. Plantarum* 85: 266-274.
- Vance CP, Graham PH, Allan DL** (2000) *Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity*. Eds. Pedrosa FO, Hungria M, Yates MG, Newton WE. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Vance CP, Gregerson RG, Robinson DL, Miller SS, Gantt JS** (1994) Primary assimilation of nitrogen in alfalfa nodules: molecular features of the enzymes involved. *Plant Sci.* 101: 51-54.
- Vance CP, Heichel GH** (1991) Carbon in N₂ fixation: limitation or exquisite adaptation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 373-392.

- VanGeule M, Ribeiro A, Solheim B, Akkermans ADL, Bisseling T, Paulowski K** (1996) Sucrose synthase and enolase expression in actinorhizal nodules of *Alnus glutinosa*: comparison with legume nodules. *Mol. Gen. Genet.* 250: 437-446.
- Varin S, Cliquet JB, Personeni E, Avice JC, Lemauiel-Lavenant S** (2010) How does sulphur availability modify N acquisition of white clover (*Trifolium repens* L.)? *J. Exp. Bot.* 61: 225-234.
- Vauclare P, Kopriva S, Fell D, Suter M, Sticher L, von Ballmoos P, Krähenbühl U, Op den Camp R, Brunold C** (2002) Flux control of sulphate assimilation in *Arabidopsis thaliana*: Adenosine 5'-phosphosulphate reductase is more susceptible to negative control by thiols than ATP sulphurylase. *Plant J.* 31: 729-740.
- Vavilov NI** (1949) The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. *Cronica Botanica* 13: 1-54
- Vermeij P and Kertesz MA** (1999) Pathways of assimilative sulphur metabolism in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol.* 181: 5833-5837.
- Vincent JM** (1970) A Manual for the Practise Study of Root Nodule Bacteria. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Vincent JM, Nutman PS, Skinner FA** (1979) Identification and classification of *Rhizobium* In: Identification Methods for Microbiologist. Soc. Appl. Bacterial. Tech. Ser. 14 (Skinner FA and Lovelock DW, eds), pp. 49-69. Academic Press, New York.
- Vitousek PM, Aber JD, Howarth RW, Likens GE, Matson PA, Schindler DW, Schelinger WH, Tilman DG** (1997) Human alteration of global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecol. Appl.* 7: 737-750.
- Voisin AS, Munier-Jolain NG, Salon C** (2010) The nodulation process is tightly adjusted to plant growth. An analysis using environmentally and genetically induced variation of nodule number and biomass in pea. *Plant Soil* 337: 399-412.
- Wallace W, Secor J, Schrader LE** (1984) Rapid accumulation of gamma amino-butyric acid and alanine in soybean leaves in response to an abrupt transfer to lower temperature, darkness, or mechanical manipulation. *Plant Physiol.* 75: 170-175.
- Walsh KB** (1995) Physiology of the legume nodule and its response to stress. *Soil. Biol. Biochem.* 27: 637-655.
- Walshaw DL, Poole PS** (1996) The general L-amino acid permease of *Rhizobium leguminosarum* is an ABC uptake system that influences efflux of solutes. *Mol. Microbiol.* 21: 1239-1252.
- Wang B, Qiu YL** (2006) Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* 16: 299-363.
- Warren CR, Adams MA** (2000) Capillary electrophoresis for the determination of major amino acids and sugars in foliage: application to the nitrogen nutrition of sclerophyllous species. *J. Exp. Bot.* 51: 1147-1157.
- Warrilow AGS, Hawkesford MJ** (1998) Separation, subcellular location and influence of sulphur nutrition on isoforms of cysteine synthase in spinach. *J. Exp. Bot.* 49: 1625-1636.
- Watanabe M, Mochida K, Kato T, Tabata S, Yoshimoyo N, Noji M, Saito K** (2008) Comparative genomics and reverse genetics analysis reveal indispensable functions of the serine acetyltransferase gene family in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 146: 310-320.

- Waters JK, Hughes BL, Purcell LC, Gerhardt KO, Mawhinney TP, Emerich DW** (1998) Alanine, not ammonia, is excreted from N₂ fixing soybean nodule bacteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 12038-12042.
- Wei H, Layzell D** (2006) Adenylate-coupled ion movement. A mechanism for the control of nodule permeability to O₂ diffusion. *Plant Physiol.* 141: 280-287.
- Weir BS** (2012) The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>
- Wheeler PR, Coldham NG, Keating L, Gordon SV, Wooff EE, Parish T, Hewinson RG** (2005) Functional demonstration of reverse transsulphuration in the *Mycobacterium tuberculosis* complex reveals that methionine is the preferred sulphur source for pathogenic mycobacteria. *J. Biol. Chem.* 280: 8069-8078.
- White J** (2006) Amino Acid Transport and Metabolism by *Rhizobium leguminosarum*. PhD Thesis. University of Reading.
- White JP, Prell J, Ramachandran VK, Poole PS** (2009) Characterization of a γ -aminobutyric acid transport system of *Rhizobium leguminosarum* bv *viviae* 3841. *J. Bacteriol.* 191:1547-1555.
- Whitehead LF, Day DA** (1997) The peribacteroid membrane. *Physiol. Plantarum* 100: 30-44
- Wienkoop S, Saalbach G** (2003) Proteome analysis. Novel proteins identified at the peribacteroid membrane from *Lotus japonicum* root nodules. *Plant Physiol.* 131:1080-1090
- Wilson AM, Harris GA** (1966). Hexose inositol and nucleoside phosphate esters in germinating seeds of crested wheatgrass. *Plant Physiol.* 42: 1416-1419.
- Wilson J, Kappler U** (2009) Sulphite oxidation in *Sinorhizobium meliloti*. *Biochim. Biophys. Acta* 1787: 1516-1525.
- Wirtz M, Droux M** (2005) Synthesis of the sulphur amino acids: cysteine and methionine. *Photosynth. Res.* 86: 345-362.
- Wirtz M, Droux M, Hell R** (2004) O-acetylserine(thiol)lyase: an enigmatic enzyme of plant cysteine biosynthesis revisited in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 55: 1785-1798.
- Wirtz M, Hell R** (2006) Functional analysis of the cysteine synthase protein complex from plants: structural, biochemical and regulatory properties. *J. Plant Physiol.* 163: 273-286.
- Wittstock U, Halkier BA** (2002) Glucosinolate research in the Arabidopsis era. *Trends Plant. Sci.* 7: 263-270.
- Witty FJ, Minchin FR** (1998) Methods for the continuous measurement of O₂ consumption and H₂ production by nodulated legume root systems. *J. Exp. Bot.* 49: 1041-1047.
- Witty JF, Skøt L, Revsbech NP** (1987) Direct evidence for changes in the resistance of legume root nodules to O₂ diffusion. *J. Exp. Bot.* 38: 1129-1140.
- Wong-Villarreal A, Velazquez-Mendez AM, Rosado-Zarrabal TL, Vite-Vallejo O, Caballero-Mellado J** (2012) Low diversity diazotrophic of culturable *Burkholderia* species associated with sorghum. *Afr. J. Microbiol. Res.* 6: 3058-3064.
- Yeh DM, Lin L, Wright CJ** (2000) Effects of mineral nutrient deficiencies on leaf development, visual symptoms and shoot-root ratio of *Spathiphyllum*. *Sci. Hortic.* 86: 223-233.

- Yi H, Galant A, Ravillious GE, Preuss ML, Jez JM** (2010) Sensing sulphur conditions: simple to complex protein regulatory mechanisms in plant thiol metabolism. *Mol. Plant* 3: 269-279.
- Yoshimoto N, Inoue E, Watanabe-Takahasi A, Saito K, Takahashi H** (2007) Posttranscriptional regulation of high-sulphate transporters in Arabidopsis by sulphur nutrition. *Plant Physiol.* 145: 378-388.
- Young JPW, Haukka K** (1996) Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol.* 133:87-94.
- Zenk MH** (1996) Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene* 179: 21-30.
- Zhang C, Meng Q, Gai J, Yu D** (2008a) Cloning and functional characterization of an O-acetylserine(thiol) lyase-encoding gene in wild soybean (*Glycine soja*) *Mol. Biol. Rep.* 35: 527-534.
- Zhang C, Meng Q, Zhang M, Huang F, Gai J, Yu D** (2008b) Characterization of O-Acetylserine(thiol)lyase-encoding genes reveals their distinct but cooperative expression in cysteine synthesis of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant Mol. Biol. Rep.* 26: 277-291.
- Zhao FJ, Fortune S, Barbosa VL, McGrath SP, Stobart R, Bilsborrow PE, Booth EJ, Brown A, Robson P** (2006) Effects of sulphur on yield and malting quality of barley. *J. Cer. Sci.* 43: 369-377.
- Zhao FJ, Hawkesford MJ, McGrath SP** (1999) Sulphur assimilation and effects on yield and quality of wheat. *J. Cereal Sci.* 30: 1-17.
- Zhao FJ, Wood AP, McGrath SP** (1999) Effects of sulphur nutrition on growth and nitrogen fixation of pea (*Pisum sativum* L.) *Plant Soil* 212: 209-219.
- Zigler K, Nemeth K, Mengel K** (1992) Relationship between electroultrafiltration (EUF) extractable nitrogen, grain-yield, and optimum nitrogen-fertilizer rates for winter-wheat. *Fert. Res.* 32: 37-42.
- Zinellu A, Sotgia S, Pasadino AM, Pasciu V, Perino MG, Tadolini B, Deiana L, Carru C** (2005) Highly sensitive simultaneous detection of cultured cellular thiols by laser induced fluorescence-capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 26: 1063-1070.
- Zuber H, Poignavent G, Le Signor C, Aimé D, Vieren E, Tadla C, Lugan R, Belghazi M, Labas V, Santoni AL, Wipf D, Buitnik J, Avice JC, Salon C, Gallardo K** (2013) Legume adaptation to sulphur deficiency revealed by comparing nutrient allocation and seed traits in *Medicago truncatula*. *Plant J.* 76: 982-996.
- Zulet A, Gil-Monreal M, Villamor JG, Zabalza A, van der Hoorn RAL, Royuela M** (2013) Proteolytic pathways induced by herbicides that inhibit amino acid biosynthesis. *PLoS ONE* 8(9): e73847.

